
22101779660


Med
K16287

TRAITÉ PRATIQUE

DE

BACTÉRIOLOGIE

I

DU MÊME AUTEUR, A LA MÊME LIBRAIRIE

TRAITÉ PRATIQUE DE BACTÉRIOLOGIE

6e édition

Ce traité sera complet en 2 volumes.

ATLAS DE MICROBIOLOGIE

Un vol. gr. in-8, 72 planches d'après nature, imprimées en 8 couleurs, cartonné.

Sommaire des planches :

Planches.

I. Bacille de la tuberculose.
II. — — —
III. — — —
III bis. — pseudo-tuberculeux.
IV. — du charbon.
V. — —
VI. — de la diphtérie.
VII. — —
VIII. Staphylocoque doré.
IX. Streptocoque pyogène.
X. Bacille typhique.
XI. — —
XII. Colibacille.
XII bis. Différenciation du colibacille et du bacille typhique.
XIII. Pneumocoque.
XIV. Pneumobacille.
XV. Bacille de la morve.
XVI. Vibrion septique.
XVII. Bacille du tétanos.
XVIII. — du charbon symptomatique.
XIX. Bacille pyocyanique.
XIX bis. — —
XX. Bacille de la lèpre. Gonocoque. Méningocoque.
XXI. Tétragène.
XXII. *Bacillus lactis aerogenes.*
XXIII. Choléra des poules.
XXIV. Bacille du rouget du porc. Septicémie de la souris. Pneumo-entérite du porc.
XXV. Peste. Influenza. Chancre mou. Mammite.
XXVI. *Micrococcus prodigiosus.*
XXVII. Bacille du lait bleu.
XXVIII. — violet.
XXIX. — polychrome.
XXX. *Bacillus chlororaphis.*
XXXI. *Ascobacterium luteum.*
XXXII. Spirille du choléra ; cultures.
XXXIII. Spirille du choléra : préparations microscopiques.
XXXIV. Choléra et Vibrions cholériques.

Planches.

XXXV. Spirille de Finckler. Spirille de Metchnikoff. Spirille du choléra.
XXXV bis. Spirochète de la syphilis.
XXXVI. *Cladothrix chromogenes.*
XXXVII. Cladothrix divers.
XXXVIII. Actinomyces.
XXXIX. Pied de Madura. Farcin du bœuf.
XL. Cladothrix divers. Farcin du bœuf. *Actinomyces.*
XLI. *Proteus vulgaris.*
XLII. *Bacillus Zopfii.*
XLIII. *Bacillus mycoides.*
XLIV. *Bacillus megaterium.*
XLV. *Bacillus subtilis.*
XLVI. *Bacillus mesentericus ruber.*
XLVII. Bacille fluorescent liquéfiant.
XLVIII. Bacille fluorescent non liquéfiant.
XLIX. Bacille de la septicémie gangreneuse de la grenouille.
L. *Bacillus rosaceus metalloides.*
LI. Bacille bleu de l'eau.
LII. Spirilles. — Leptothrix. — Sarcine.
LIII. Pourriture d'hôpital. — Fièvre jaune. — Pelade.
LIV. Pseudo-tuberculoses.
LV. Phagocytose et Inclusions cellulaires.
LVI. Bactéries diverses de l'eau ; cultures sur plaques.
LVII. Ferments acétiques.
LVIII. Muguet. — Levures.
LIX. Hématozoaires.
LX. Coccidies.
LXI. Pseudo-tuberculose à oïdium.
LXII. Blastomycoses.
LXIII. Trypanosomes et Piroplasmes.
LXIV. Sporotrichoses.
LXV. Dysenteries.
LXVI. Bacille de la peste.
LXVII. Bactéries des eaux.
LXVIII. — —

LES SUBSTANCES ALIMENTAIRES

ÉTUDIÉES AU MICROSCOPE SURTOUT AU POINT DE VUE DE LEURS ALTÉRATIONS ET DE LEURS FALSIFICATIONS.

Un vol. in-8, 512 pages, avec 24 planches coloriées, dont 8 reproduites d'après les études sur le vin de M. L. Pasteur, et 408 figures dans le texte........................ 14 fr.

10817. — Corbeil. Imprimerie Éd. Crété.

TRAITÉ PRATIQUE

DE

BACTÉRIOLOGIE

PAR

E. MACÉ

PROFESSEUR D'HYGIÈNE A LA FACULTÉ DE MÉDECINE
DIRECTEUR DE L'INSTITUT SÉROTHÉRAPIQUE DE L'UNIVERSITÉ DE NANCY

SIXIÈME ÉDITION

MISE AU COURANT DES TRAVAUX LES PLUS RÉCENTS

I

MORPHOLOGIE ET BIOLOGIE GÉNÉRALES
TECHNIQUE BACTÉRIOLOGIQUE
CLASSIFICATION ET DESCRIPTION

I. — COCCACÉES.

II. — BACTÉRIACÉES :
Bacilles du charbon, de la tuberculose, de la lèpre, de la morve et de la diphtérie.

Avec 284 figures dans le texte, noires et coloriées



PARIS
LIBRAIRIE J.-B. BAILLIÈRE ET FILS
19, rue Hautefeuille, près du boulevard Saint-Germain

—

1912



PRÉFACE

Je présente au public la sixième édition du TRAITÉ PRATIQUE DE BACTÉRIOLOGIE, paru une première fois en 1888, et auquel la bienveillance de mes lecteurs a valu un accueil qui m'a véritablement fait honneur. Je me suis appliqué à le tenir au courant des meilleurs travaux récents, faits dans une science qui a une aussi rapide extension.

Les notions mises en lumière depuis plus d'un demi-siècle par les travaux de Pasteur sur les Microbes ont conduit à des idées toutes nouvelles sur le rôle que jouent dans le monde ces êtres inférieurs et, en particulier, sur la place importante qui doit leur être réservée dans l'étude de la médecine.

Certes, ils sont intéressants et utiles les phénomènes de décomposition, de fermentation et de putréfaction que certains de ces êtres provoquent journellement sous nos yeux, en accomplissant, dans l'équilibre de la vie dans le monde, un rôle si important, et dont l'homme, pour certains d'entre eux, a su tirer si grand profit ; mais combien plus importants encore pour le médecin sont les changements profonds que peut produire dans l'économie la présence d'autres organismes très voisins des premiers. Ce sont là des notions qui ont profondément modifié les données relatives à l'étiologie et à la pathogénie des maladies infectieuses.

En présence d'idées aussi spéciales, il est bien permis d'hésiter. La médecine a été bouleversée par tant de systèmes, qui ont disparu faute de bases assez solides, qu'il est toujours sage de pratiquer le doute scientifique dans ces conditions. Il faut bien certainement se garder d'un enthousiasme excessif, mais aussi d'un scepticisme poussé trop loin, et aborder ces études en prenant pour guide, ici surtout, les principes si féconds de la méthode expérimentale, « ce raisonnement à l'aide duquel nous soumettons méthodiquement nos idées à l'expérience des faits (1) ».

(1) Cl. BERNARD, *Introduction à l'étude de la médecine expérimentale*, p. 7.

L'importance de l'étude des Microbes se confirme tous les jours. Pour la médecine, en particulier, elle a largement contribué à éclairer l'étiologie si obscure d'affections redoutables, et permis de poser des conclusions hygiéniques dont on a pu déjà apprécier la grande valeur pratique ; les méthodes de vaccination et de sérothérapie ont fourni des résultats positifs précieux. Aussi doit-on s'applaudir d'en voir l'enseignement gagner du terrain et prendre sa place officielle dans les programmes de toutes nos Facultés de médecine.

Il est, dès lors, d'un grand intérêt de faire connaître le mieux possible les méthodes bactériologiques. Aussi avons-nous cru faire œuvre utile en publiant ce livre, que nous nous sommes efforcé de rendre clair et pratique. Rien n'a été négligé pour atteindre ce but. Un grand nombre de détails ont été donnés d'après nature ; bien des chapitres ont été rédigés au laboratoire même. L'accueil qui lui a été réservé, depuis ses débuts, est la meilleure démonstration de l'utilité d'un tel travail.

Le plan du livre était tout naturellement tracé. Avant d'aborder la partie descriptive, il est très utile de s'y préparer.

Il eût été difficile de faire l'histoire des Bactéries actuellement connues sans exposer avec quelques détails les caractères généraux de ces êtres inférieurs, sans préciser ce que l'on sait aujourd'hui de leur morphologie et de leur biologie.

C'est ce qui est fait dans une Première partie, en choisissant de préférence les exemples parmi les espèces intéressantes au point de vue médical ou faciles à se procurer.

Les procédés divers, qui conduisent à l'isolement et à la culture des Bactéries, ainsi que les méthodes spéciales d'examen microscopique, ont été l'objet de soins tout spéciaux. C'est en effet le côté le plus important de ces études, qui nécessite une pratique de quelque durée. L'exposition et la critique de ces questions forment tout naturellement une Deuxième partie.

La description des espèces, qui forme la Troisième partie, tient ici une grande place. Pour un tel ouvrage, il est certainement préférable de parler de beaucoup des espèces suffisamment décrites jusqu'ici, en citer même certaines mal connues pour être complet. On reconnaîtra bien vite à la pratique que le reproche qui pourrait en être fait ne serait pas fondé ; l'utilité de tous les détails apparaît clairement lorsqu'on se trouve aux prises avec une difficulté à résoudre. C'est du reste nécessaire pour l'étude des cas complexes.

Cependant, le nombre des espèces nouvelles décrites dans ces dernières années devient si considérable, qu'il est nécessaire de se limiter et d'attendre souvent confirmation des données énoncées. Les espèces pathogènes, surtout, ont été l'objet d'une étude détaillée ; leurs caractères ont été approfondis ; le mode d'action dans l'organisme, leur préparation, leurs propriétés, leur culture et leur examen indiqués avec soin. Des tableaux de groupement ont été mis à la suite des genres les plus riches en espèces, permettant ainsi une détermination plus rapide et plus facile.

Une Quatrième partie comprend l'étude bactériologique de quelques cas spéciaux du plus haut intérêt, l'air, l'eau, le sol, le corps humain, à l'état normal et pathologique. Pour cette dernière question, en particulier, un *Sommaire de Bactériologie clinique* sera pour le médecin un guide commode à consulter.

Dans le temps écoulé depuis l'époque de la première édition de ce livre, les progrès faits dans cette science, créée par notre illustre maître Pasteur, ont été considérables. Aussi, bien que pour les éditions ultérieures rien n'ait été modifié dans la disposition générale de l'ouvrage, il a fallu faire des remaniements complets, de très nombreuses additions nécessitées par les découvertes nouvelles. Les additions portent un peu sur toutes les parties du livre. Il fallait naturellement indiquer les nouvelles méthodes d'observation et les perfectionnements d'anciennes ; il fallait surtout insister sur les actions biologiques si importantes et si complexes, donner une large place à l'étude de ces curieuses substances que produisent les Bactéries dans les milieux où elles vivent, milieux de culture ou organismes vivants, et à l'application de certaines d'entre elles au diagnostic et à la thérapeutique humaine ou animale ; voir aussi tout ce qui peut être mis en œuvre par l'organisme pour se défendre contre l'atteinte du microbe, cette question de terrain tendant certainement à gagner une grande importance ; étudier enfin un nombre respectable d'espèces décrites par les chercheurs de tous pays qui s'adonnent avec tant d'ardeur à cette science. Ceci a été fait en s'efforçant de conserver les lignes générales et principalement le caractère pratique qui a attiré au *Traité de Bactériologie* des appréciations si flatteuses.

Ces raisons suffisent amplement, il semble, pour justifier l'extension qu'a prise ce livre, que l'auteur aurait préféré plutôt conserver court en condensant certaines parties. Il a dû forcément l'augmenter pour rester clair, pensant qu'un tel exposé doit être

avant tout complet pour être facile à comprendre et fructueux pour l'étude.

Pour en faciliter l'usage, le livre a dû être divisé en deux volumes.

Un premier volume comprend les généralités sur la morphologie et la biologie des Bactéries, la technique bactériologique et le commencement de la description des espèces, l'étude des Coccacées et celle de cinq espèces importantes de Bacilles, les Bacilles du charbon, de la tuberculose, de la lèpre, de la morve et de la diphtérie.

Le second volume renferme l'étude de la plupart des espèces des Bactériacées, l'étude bactériologique de milieux importants, l'air, l'eau, le sol, le corps humain, et un sommaire de Bactériologie clinique.

Dans la détermination et l'étude des espèces, des types principaux surtout, de bonnes figures sont d'un très grand secours. Aussi, comme véritable complément de ce livre, aidé par l'intelligente initiative de nos sympathiques éditeurs, avons-nous publié un *Atlas de Microbiologie* de soixante-douze planches reproduites en couleurs et en phototypie, représentant les principales espèces microbiennes qui peuvent intéresser. La plus large part y est réservée aux Bactéries, surtout aux Bactéries pathogènes, comme il est facile de s'en rendre compte dans le sommaire des planches exposé ci-contre au titre du livre.

E. MACÉ.

Institut d'Hygiène et de Bactériologie
de la Faculté de médecine de l'Université de Nancy.

TRAITÉ PRATIQUE

DE

BACTÉRIOLOGIE

INTRODUCTION

1. HISTORIQUE

La connaissance des êtres microscopiques a naturellement marché de pair avec l'invention des systèmes optiques grossissants destinés à les rendre visibles. Aussi, si la croyance que l'air et l'eau fourmillent d'êtres de petite taille se retrouve souvent dans la doctrine des anciens, elle ne pouvait s'affirmer et passer dans le domaine de l'observation et de l'expérience qu'à partir du moment où des combinaisons de lentilles assez perfectionnées permirent d'étudier *de visu* ces petits êtres.

C'est le naturaliste hollandais Leeuwenhoeck (1632-1723) (1), de Delft, qui, au grand étonnement du monde savant de son époque, démontra l'existence d'organismes vivants dont la petitesse avait défié jusqu'alors la sagacité des curieux de la nature. Il usait pour les observer de petites lentilles simples, biconvexes, fixées dans une monture d'argent. Pour déterminer leur grandeur, il les comparait à un grain de poussière de un quart de millimètre, en examinant les deux objets avec la même lentille. Malgré l'imperfection si grande de ses procédés d'observation, il a reconnu et décrit sommairement plusieurs espèces de Bactéries et a laissé entrevoir le grand rôle que ces êtres pouvaient jouer dans les phénomènes de putréfaction et de décomposition. Il en a signalé la présence dans l'eau, les infusions végétales, dans l'intestin des mouches, des grenouilles, du poulet, dans les matières intestinales de l'homme, où il a fort bien reconnu leur augmentation très notable dans les cas de diarrhée, premier appoint à la pathologie humaine, dans le tartre dentaire et dans la salive. Il a décrit des formes en bâtonnets, en longs filaments droits ou courbés, en tire-bouchon; plusieurs lui ont montré des mouvements très manifestes. C'était beaucoup pour le temps et surtout les moyens d'investigation si imparfaits dont disposait Leeuwenhoeck; aussi ne sait-on vraiment ce qu'on doit le plus admirer, de la nouveauté et de la netteté des résultats annoncés ou de l'habileté de l'expérimentateur.

Après Leeuwenhoeck, l'étude de ces êtres inférieurs fut délaissée,

(1) Leeuwenhoeck, Arcana naturæ detecta. Lugduni Batavorum, 1680.

l'emploi du microscope simple n'en permettant que fort difficilement l'observation. La découverte du microscope composé fit faire un grand pas à cette partie de la science de la nature.

Otto Frédéric Müller (1) l'appliqua le premier à la connaissance des êtres inférieurs et le fit servir à leur description et à leur classification. Il réussit, et ceci à sa grande gloire, à mettre un ordre relatif dans ce fouillis d'êtres microscopiques, que le grand Linné lui-même avait cru devoir laisser de côté et pour lesquels il avait créé son genre *Chaos*, véritable *caput mortuum* où se trouvaient réunis des êtres et des choses bien dissemblables, avouant ainsi très simplement son ignorance en cette partie.

Müller répartissait les Bactéries dans les deux genres *Monas* et *Vibrio*, dont les dénominations subsistent encore. Les espèces du genre *Monas*, incomplètement décrites et mal figurées, sont peu reconnaissables; deux de ces espèces, sur dix qu'il renferme, sont bien certainement de courtes Bactéries en bâtonnets. Dans le genre *Vibrio*, il décrit trente et une espèces, dont six seulement sont des Bactéries véritables. On trouve réunis là des Algues Diatomées et Desmidiées (son *Vibrio lunula* est un *Closterium*), des Infusoires Flagellés (son *Vibrio acus* est un Euglénien), des Infusoires Ciliés (des Paraméciens) et des Nématodes (Anguillules).

Lamarck (2), Bruguière (3) et Bory de Saint-Vincent (4) se bornèrent à reproduire, intactes ou peu modifiées, les données du naturaliste danois, qui firent ainsi loi pendant près d'un demi-siècle.

Ehrenberg, usant d'instruments perfectionnés, fit faire de grands progrès à l'étude des êtres microscopiques. On trouve dans son grand ouvrage, *Die Infusionsthierchen als volkommene Organismen* (Berlin, 1833), des résultats bien supérieurs à ceux énoncés par ses devanciers. Il sépare les êtres qui nous occupent de ceux bien différents qui en avaient été rapprochés, et les réunit dans sa famille des *Vibrionia*, qu'il caractérise de la façon suivante : « Animaux filiformes, sans intestin, nus, sans organes externes, réunis en chaînes ou séries filiformes par l'effet d'une division spontanée incomplète ». Cette famille comprenait les quatre genres suivants :

Bacterium : Bâtonnets rigides à mouvement vacillant.

Vibrio : Corps filiforme, susceptible de mouvements ondulatoires comme un serpent.

Spirillum : Corps filiforme, en hélice, inflexible.

Spirochæte : Corps en hélice, formant un long cordon flexible.

Dujardin (5) reprend, en les modifiant peu, les idées d'Ehrenberg. Il donne des détails nouveaux et intéressants sur le développement des Bactéries dans diverses infusions et sur la manière de les obtenir et de les étudier. Des quatre genres d'Ehrenberg, il n'en garde que trois, en réunissant le genre *Spirochæte* au genre *Spirillum*, fusion qui a été

(1) Otto Fr. Muller, Vermium terrestrium et fluviatilium Historia, 1774, et Animalcula infusoria fluviatilia et marina, 1786.

(2) Lamarck, Histoire des animaux sans vertèbres. Paris, 1815-1819, et 2e édition par Deshayes et Milne-Edwards. Paris, J.-B. Baillière, 1835-1845.

(3) Bruguière, Encyclopédie méthodique. Paris, 1824.

(4) Bory de Saint-Vincent, Encyclopédie méthodique. Paris, 1824.

(5) F. Dujardin, Histoire naturelle des Zoophytes, Infusoires. Suites à Buffon. Paris, 1841.

approuvée depuis par bien des observateurs, les caractères distinctifs de ces deux genres n'ayant qu'une valeur relative d'ordre par trop secondaire.

Les résultats obtenus à cette époque étaient sérieux et pour beaucoup à conserver : certains d'entre eux ont été bien des fois confirmés et se retrouvent encore dans les meilleurs travaux actuels. Le microscope achromatique se perfectionnait de jour en jour et permettait alors, surtout entre les mains d'observateurs expérimentés comme Dujardin, d'énoncer des conclusions que l'on pouvait considérer comme fortement appuyées, sinon tout à fait certaines.

Jusqu'alors, l'apparition de ces êtres si simples, de ces *animalcules*, comme on disait à l'époque, dans les infusions, était regardée comme un simple phénomène fortuit. On observait en même temps des altérations très appréciables des milieux en question, mais on était loin de supposer qu'il y avait entre ces deux ordres de faits des rapports si étroits, des rapports de cause à effet. Si même on cherchait à rapprocher l'une de l'autre ces deux manifestations d'un même phénomène, c'était pour faire dépendre la seconde de la première, se faisant ainsi une loi de l'ancien adage : *Corruptio unius, generatio alterius*. Et si Leeuwenhoeck avait constaté l'augmentation considérable des êtres microscopiques des selles dans les cas de diarrhée, si bien des savants, Linné entre autres, étaient portés, par de simples vues de l'esprit, il faut le dire, à considérer ces Vibrions comme des éléments de contage dans plusieurs états pathologiques, rien de positif n'avait été avancé, aucun fait ne venait étayer ces suppositions toutes gratuites.

Les esprits étaient si peu tournés de ce côté que Davaine et Rayer (1), en 1850, signalent, tout simplement comme un fait curieux et sans y attacher grande importance, la présence d'une Bactérie en bâtonnets dans le sang des animaux morts de la curieuse maladie appelée *sang de rate*.

Déjà cependant, dès 1831, Braconnot, remarquant que certaines substances, telles que le chlore, l'acide sulfureux, l'acide nitrique, employées comme destructeurs des agents, tout à fait inconnus alors, des maladies contagieuses, possédaient aussi des propriétés antifermentescibles énergiques, concluait au rapprochement de la contagion et de la fermentation. Dans le même ordre d'idées, Cagniard-Latour (2), étudiant la fermentation vineuse, proclamait qu'elle n'était qu'une conséquence de la végétation et de la vie des globules de levure que l'on observait toujours dans le liquide sucré qui se transformait.

Arrive la période actuelle. C'est à Pasteur que revient le grand honneur d'avoir établi avec certitude les connexités étroites ou les rapports de causalité qui unissent les altérations de certains liquides, certaines fermentations, au développement et à la vie, dans leur intérieur, d'êtres vivants des plus simples, de Bactéries. C'est dans son travail sur la fermentation lactique qu'il a posé les premières bases certaines de l'étude physiologique de ces êtres (3). Ce qu'il avait démontré pour

(1) Rayer, Inoculation du sang de rate (*Mém. de la Soc. de Biol.*, 1850, p. 141).

(2) Cagniard-Latour, Mémoire sur la fermentation vineuse (*Ann. de chim. et de phys.*, 2e série, XXVIII, 1828).

(3) Pasteur, Mémoire sur la fermentation appelée *lactique* (*Ann. de chim. et de phys.*, 3e série, LII, p. 404).

cette fermentation, il l'étendit à d'autres et arriva à en former cette suite d'études qui constitue une des plus belles gloires scientifiques de notre pays.

Guidé par les principes que Pasteur posait en maître, Davaine reprit les observations qu'il avait faites quelques années avant, avec Rayer, sur le sang de rate, et parvint à établir, par des séries d'expériences et une suite de déductions habiles (1), que la maladie reconnaissait bien certainement pour cause les Bactéries que l'on trouve en grande abondance dans le sang des moutons morts ou malades.

Pasteur avait créé la physiologie des Bactéries ; Davaine venait ainsi de fonder la pathologie bactérienne.

Pasteur (2) bientôt montre la voie à suivre, en élucidant dans tous leurs détails deux terribles maladies des vers à soie, la ruine des éleveurs, la *pébrine*, causée par des microorganismes de la classe des Sporozoaires, et la *flacherie*, d'origine manifestement bactérienne. Ce sont les premières études complètes d'une affection *contagieuse* ; on y puise encore aujourd'hui de remarquables enseignements, on en tire de lumineuses conclusions relatives à l'étude de maladies reconnues depuis de même origine, où se trouvent aussi en présence ces mêmes questions de contagion, de réceptivité, de milieu, d'hérédité, qui jouent un si grand rôle dans l'étiologie et la pathogénie des maladies infectieuses.

Coze et Feltz (3), peu après, montraient que les profonds changements du sang, dans les maladies infectieuses humaines, étaient dus aussi à des Bactéries, et donnaient une étude magistrale d'une de ces affections les plus terribles, la *septicémie*.

Les plus belles applications de ces idées fécondes se trouvent sans contredit dans les recherches sur la *maladie charbonneuse*, où des maîtres tels que Pasteur et Koch ont mis tout leur savoir et sont arrivés à faire de l'étude de cette maladie « la base de la doctrine parasitaire des maladies contagieuses (4) ».

Les progrès de cette science ont été si rapides qu'il serait très long et difficile d'en donner une histoire tant soit peu complète. Autour de chacun des deux grands noms que nous venons de citer, il s'est formé une véritable école d'où est issue une pléiade de travailleurs assidus ; beaucoup ont conquis dans la science une illustration méritée : leur nom se rencontrera en bien des pages de ce livre.

2. DE LA PLACE DES BACTÉRIES PARMI LES ÊTRES VIVANTS

Pour les premiers observateurs cités, Müller, Ehrenberg, Dujardin, les Bactéries faisaient, sans aucun doute, partie du règne animal : la motilité bien évidente des quelques espèces connues et décrites était, à leurs yeux, un caractère qui devait forcément manquer à la plante. Plus tard, lorsque Davaine eut prouvé, en étudiant la Bactérie du charbon, l'immobilité absolue de certaines espèces dans tout le cycle de leur exis-

(1) Davaine, Recherches sur le sang de rate (*C. R. de l'Acad. des sc.*, 1863 et 1864). Réimprimé dans « l'Œuvre de Davaine ». Paris, J.-B. Baillière, 1889, 1 vol. in-8.

(2) Pasteur, Études sur la maladie des vers à soie. Paris, Gauthier-Villars, 1869.

(3) Coze et Feltz, Recherches cliniques sur les maladies infectieuses. Paris, J.-B. Baillière, 1872.

(4) Straus, Le charbon des animaux et de l'homme. Paris, 1887.

tence, espèces qui, sans conteste, ne pouvaient en rien d'autre être distinguées des voisines, et que la motilité ne paraissait plus être le propre de l'animal, les idées changèrent. Davaine (1) en fait des Algues voisines des *Oscillaires*, auxquelles les rattachent les *Beggiatoa* ou *Sulfuraires*. Rabenhorst (2) partage cette opinion et les classe dans sa tribu des *Oscillariées*.

Depuis lors, la plupart des naturalistes sont unanimes à les placer à la base du règne végétal. Cependant, ici surtout, aucun des caractères que l'on peut donner comme raison ne doit être considéré comme critérium d'une valeur absolue : il faut plutôt s'appuyer sur un ensemble de faits, sur une impression générale, que sur telle ou telle particularité semblant trop exclusive à une étude peu approfondie.

Hæckel (3) range les Bactéries parmi ses *Protistes*, à côté des *Monères*; Pasteur les a longtemps regardées comme des *Infusoires*, à l'exemple des premiers observateurs cités.

Cette dernière opinion paraît toutefois recevoir confirmation de récentes recherches sur la structure intime des éléments cellulaires des Bactéries. Les travaux de de Bary (4), Balbiani (5), Künstler (6), Bütschli (7) ont conduit ces observateurs à rapprocher les Bactéries des Flagellés. Il faut reconnaître que les raisons qu'ils mettent en avant sont excellentes.

Les uns, Van Tieghem (8) entre autres, les classent dans les Algues, à côté des *Oscillariées* et des *Nostoccacées*, où elles forment une série parallèle dépourvue de chlorophylle. Un des grands arguments qui servent à étayer cette combinaison est la présence, chez quelques espèces de Bactéries, de pigment vert qu'on a hâtivement et sans preuves rapproché de la chlorophylle, et les rapports que présentent avec certaines Algues quelques espèces tout à fait aberrantes qui sont probablement à séparer du groupe.

Il est peut-être plus rationnel, avec Naegeli, de Bary, Cohn, etc., d'en faire des Champignons. Ils se rattachent à ces végétaux par le manque de chlorophylle et par toute une série de propriétés biologiques. Les fermentations les rapprochent des *Saccharomycètes*, dont les éloigne toutefois leur genre de reproduction végétative, les Levures se multipliant par bourgeonnement et les Bactéries par division. C'est cette dernière particularité qui leur a fait donner par Naegeli le nom de *Schizomycètes* (σχίζειν, diviser ; μύκης, champignon), et par Cohn celui de *Schizophytes* (σχίζειν, diviser ; φυτόν, plante).

Quoi qu'il en soit, quelle que soit la place que l'on veuille assigner au

(1) Davaine, Recherches sur les Vibrioniens (*C. R. de l'Acad. des sc.*, 1864). Voy. aussi « l'Œuvre de Davaine ».

(2) Rabenhorst, Flora europæa Algarum. 1865.

(3) Hæckel, Le règne des Protistes, traduit par J. Soury. Paris, 1879.

(4) De Bary, Morphologie und Biologie der Pilze, Mycetozoen und Bacterien. Leipzig. 1884.

(5) Balbiani, *Journ. de micr.*, 1886 et suiv.

(6) Künstler, De la position systématique des Bactériacées (*Journ. de micr.*, 1885).

(7) Bütschli, Ueber den Bau der Bacterien und verwandter Organismen. Leipzig, 1890.

(8) Van Tieghem, Traité de botanique, p. 1109.

groupe des Bactéries, il est de toute nécessité de fixer son étendue et de préciser ses caractères. Aussi le nom de *Bactéries*, proposé par Cohn en 1872, semble-t-il à préférer aux autres, en particulier à des dénominations beaucoup plus vagues, englobant des êtres tout à fait dissemblables. Le rôle de ces espèces est en effet trop spécial, leur constitution assez différente, pour les laisser confondues avec d'autres êtres inférieurs.

Le nom de *Microbes*, proposé par Sédillot en 1878, convient, en même temps qu'aux Bactéries, à des Levures, des Moisissures, à des animaux inférieurs, Infusoires ou autres; il en est de même du terme *Microorganismes*. L'histoire de chacun de ces groupes d'êtres est assez compliquée pour qu'elle gagne en certitude et en clarté à être séparée de celle de ses voisins. Il faut cependant convenir que des désignations générales, comme celles de *Microbes*, de *Microbiologie*, de *Microbie*, sont à conserver et souvent précieuses à employer, surtout lorsqu'on a en vue des êtres parfois très dissemblables systématiquement, mais que rapprochent certaines de leurs propriétés biologiques.

Si l'on mesurait l'importance de certains êtres à leurs dimensions, il est certain que les nôtres tiendraient un rang bien infime dans la série des organismes vivants. On arriverait à un même résultat en mettant en ligne la constitution de leur corps cellulaire. Si, au contraire, on s'attache aux actes biologiques qui nous frappent, on arrive à leur reconnaître une importance de tout premier ordre, quand on voit quelle est la diversité des réactions vitales qui nous sont manifestées, quelle est la dispersion étonnante de beaucoup de ces espèces et de quels phénomènes, en apparence secondaires, beaucoup d'entre elles viennent compliquer les actes vitaux que nous considérons comme normaux. On en sera convaincu lorsqu'on connaîtra plus loin le rôle immense que les Bactéries jouent dans le monde organique vivant ou mort.

3. ORIGINE DES BACTÉRIES

L'apparition rapide des Bactéries dans les liquides nutritifs purs en apparence, effet de la grande dispersion de ces êtres, a été une des principales objections des partisans de la *génération spontanée*. Perdant pied à pied du terrain au fur et à mesure que l'observation et l'expérimentation prenaient place dans les sciences, cette doctrine eut comme un renouveau lors de la découverte du microscope et des infiniment petits dont il révélait la présence. Redi venait de prouver l'inanité de cette théorie qui faisait naître directement des matières corrompues les Insectes et les Vers intestinaux (1) et avait ainsi apporté une preuve éclatante à la fameuse loi de la génération : *Omne vivum ex ovo*, émise peu de temps avant par Harvey, qui devait se confirmer plus tard pour tous les êtres. Battus sur ce terrain, les hétérogénistes descendirent de plusieurs degrés dans la série des êtres vivants ; ils se retranchèrent derrière les phénomènes si obscurs encore de la génération de ces *animaux microscopiques*, et là se crurent, en toute bonne foi, parfaitement inexpugnables.

Pour eux, les matières albuminoïdes des infusions, qui provenaient

(1) Redi, Esperienze intorno alia generazione degli insetti. Firenze, 1688.

de la décomposition d'êtres vivants, conserveraient un restant de force vitale qui leur permettrait de s'organiser à nouveau lorsque des conditions extérieures favorables se présenteraient. Ces conditions étaient surtout, on le sait, la chaleur, l'humidité, l'air.

C'était, pendant la dernière moitié du XVIII[e] siècle, la théorie du savant anatomiste hollandais Needham (1), admise et tant prônée par Buffon qui y trouvait un appui pour sa théorie des *molécules organiques*, et critiquée point à point avec succès par Spallanzani, dans des débats restés mémorables (2). Ce fut, à notre époque, celle de Pouchet, Joly, Trécul, savants de haut mérite, auxquels Pasteur répondit si victorieusement.

Pour Pouchet (3), la *pellicule proligère*, que l'on voit rapidement se former à la surface des infusions organiques exposées à l'air, était le lieu où les germes se formaient de toutes pièces, « comme les germes dans le stroma de l'ovaire des Vertébrés ». D'où seraient venus, du reste, les êtres qu'il observait dans ses infusions, puisque, selon lui, l'air n'en renfermait qu'exceptionnellement les germes ?

On trouvera dans les *Comptes rendus de l'Académie des sciences* et dans les *Bulletins de l'Académie de médecine*, depuis l'année 1863, la série des débats passionnés qu'a soulevés cette question de la *génération spontanée*, et l'exposé des remarquables expériences sur lesquelles Pasteur s'est basé pour la réfuter en toute assurance. De ces expériences (4), qui sont, on peut le dire, le point de départ d'une science nouvelle, le Maître a tiré les conclusions suivantes, qui mettent à néant les assertions multiples des hétérogénistes :

1° Un liquide stérilisé placé à l'abri des impuretés atmosphériques ne présente jamais de ces Bactéries ;

2° Les poussières seules de l'air provoquent l'éclosion de ces Bactéries;

3° L'air débarrassé de ces corpuscules est impropre à féconder les infusions.

On verra les importants résultats théoriques et pratiques qu'a donnés l'application de ces principes.

La doctrine de la spontanéité, vieille de près de deux mille ans, puisqu'on la trouve clairement exposée dans Lucrèce (5), peut, dès lors, être considérée comme une illusion, dans l'état actuel des choses au moins, et les débats clos par ces paroles de Pasteur : « J'ai cherché pendant vingt ans la génération spontanée, ma conclusion a été que cette doctrine est chimérique. » (*Bulletin de l'Académie de médecine*, 16 juillet 1878.)

Il reste à citer, pour mémoire, la théorie des *Microzymas* de Béchamp. C'est le nom que ce savant chimiste donne aux granulations amorphes

(1) Needham, Découvertes faites avec le microscope. Leyde, 1747.

(2) Spallanzani, Opuscules de physique animale et végétale, traduit de l'italien par Jean Sennebier. Paris, 1777.

(3) Pouchet, Hétérogénie ou Traité de la génération spontanée. Paris, J.-B. Baillière, 1850.

(4) Pasteur, Mémoire sur les corpuscules organisés qui existent dans l'atmosphère, examen de la doctrine des générations spontanées (*Ann. des sc. nat., Zool.*, 4e série, t. XVI, 1861, et *Ann. de chim. et de phys.*, 1862).

(5) Lucrèce, De natura rerum, lib. V.

de toutes sortes, protéiques, amylacées, grasses, qui se remarquent, en très grande abondance souvent, dans tout protoplasma, animal ou végétal. Pour lui (1), ces *Microzymas* (μικρός, petit ; ζύμη, levain, ferment) sont « la forme vivante, réduite à sa plus simple expression, ayant la vie en soi, sans laquelle la vie ne se manifeste nulle part ». « C'est l'unité vitale irréductible, physiologiquement indestructible, dont la cellule même est formée. » Après la mort de la cellule, ces organites s'épandent au dehors et donnent naissance, immédiatement ou longtemps après, à des formes vitales plus élevées, à des Bactéries. Les *Microzymas* sont répandus partout, n'attendent pour évoluer que des conditions favorables, ce qui explique la rapide apparition d'êtres inférieurs dans les liquides nutritifs abandonnés à l'air. Ils présentent une résistance énorme aux agents de destruction ; le temps lui-même, ce grand facteur du transformisme, n'a guère de prise sur eux, puisque l'auteur de la théorie en a trouvé abondamment dans le sein de dépôts de craie et au milieu de roches calcaires, enfermés là dès l'époque secondaire et attendant depuis des milliers de siècles les conditions nécessaires pour donner des Bactéries. Cette découverte des *Microzymas géologiques* (2) fait juger de suite la théorie.

Il semble bien prouvé aujourd'hui qu'on n'observe d'apparition de Bactéries, et en général d'aucun être vivant, dans des milieux nutritifs, liquides ou solides, que lorsqu'un individu d'une espèce, soit de la forme végétative ordinaire, soit de forme spéciale modifiée en vue d'une résistance plus grande aux agents nuisibles de la vie de l'espèce, la spore, arrive dans ce milieu, où il trouve des conditions favorables à sa multiplication. La petitesse, le nombre immense, l'aire de dispersion si étendue de ces êtres expliquent leur apparition rapide dans les expériences où l'on ne s'est pas mis très rigoureusement à l'abri de l'invasion. C'est ce qui explique les résultats erronés des hétérogénistes ; c'est aussi la raison des expériences concluantes de Pasteur.

On sait, en effet, que l'on rencontre partout de ces *germes*. Non seulement ils abondent dans l'air, dans l'eau, dans le sol, mais ils pullulent sur nous et autour de nous, dans tous les coins de nos demeures, sur nos habits, à la surface du corps et même normalement dans toutes les cavités naturelles du corps en libre contact avec l'air extérieur. Cette excessive dispersion est la cause de la difficulté que l'on a d'obtenir des milieux nutritifs qui en soient absolument dépourvus.

Beaucoup n'attendent, sur place, pour se multiplier et porter atteinte au fonctionnement de la machine animale, que des circonstances favorables à leur vie, circonstances qui varient suivant chaque espèce et suivant la nature physique ou biologique du milieu. Ce sont les espèces dites *pathogènes*. Lorsqu'elles sont introduites dans l'organisme, elles se développent à ses dépens, comme dans un simple milieu nutritif. Il se produit alors une véritable lutte pour la vie entre les cellules de l'être vivant et ces éléments étrangers qui cherchent à vivre en

(1) Béchamp, Les Microzymas dans leurs rapports avec l'hétérogénie, l'histogénie, la physiologie et la pathologie. Paris, J.-B. Baillière, 1883.

(2) Béchamp, Sur les Microzymas géologiques de diverses origines (*C. R. de l'Acad. des sc.*, 1870, t. LXX, p. 941).

parasites. Si l'organisme réussit dans son effort pour éliminer les Bactéries, la guérison survient; s'il se laisse envahir, il succombe.

Les espèces de ce groupe semblent avoir traversé sans varier les longues périodes qui séparent l'époque actuelle des temps anciens. Miller (1) a pu reconnaître des filaments bien nets de *Leptothrix buccalis* dans le tartre dentaire des momies égyptiennes, Van Tieghem (2) retrouver la *Bactérie de la fermentation butyrique*, avec ses formes particulières, dans des minces coupes de bois silicifiés du terrain houiller de Saint-Étienne.

Les recherches suivies de Renault (3) démontrent d'une façon indubitable la présence fréquente de Bactéries dans les différentes couches géologiques fossilifères, en rapport intime avec les restes de plantes et d'animaux que l'on y rencontre. Ces Bactéries, par leurs rapports que l'on peut très bien saisir sur des coupes minces de débris silicifiés, paraissent avoir joué un rôle important dans les processus de décomposition dont ces corps ont été le siège, tout comme aujourd'hui des espèces actuelles agissent, dans des conditions similaires, sur les débris animaux ou végétaux. Diverses espèces de *Micrococcus* paraissent surtout être fréquentes ; les formes bacillaires sont plus rares et semblent ne se rencontrer qu'au milieu des tissus, pour faire penser que les Bacilles n'apparaissaient qu'à la fin des fermentations commencées par les Microcoques. La transformation des parois végétales en houille, en particulier, peut bien avoir demandé, comme condition préalable, l'action sur les tissus des plantes des espèces bactériennes qui se rencontrent en grande abondance dans beaucoup des débris examinés. Ces microbes jouaient un rôle important dans la formation de la houille, des bogheads, des lignites, voire même des pétroles, et se retrouveraient encore actuellement dans les phénomènes similaires de la production de la tourbe.

Il n'est guère possible de rapporter les espèces observées à celles qui existent aujourd'hui. Les noms de *Micrococcus petrolei* et *Micrococcus lignitum* ne peuvent être admis que comme problématiques, les caractères essentiels, les caractères culturaux et biologiques, ne pouvant être connus. On ne peut que constater quelques similitudes de formes. On vient de voir que Van Tieghem a trouvé dans des plantes de l'époque houillère des éléments semblables à ceux, bien caractéristiques, du *Bacillus amylobacter*. Renault a retrouvé dans des os, des écailles de poisson, des dents enfermées dans des coprolithes, excréments fossiles, des Microcoques et des Bacilles rappelant, par leurs formes et leurs dimensions, les Microcoques et les Bacilles décrits par Vignal, Galippe, Miller, et qui déterminent maintenant la carie des os et des dents.

Les processus de décomposition actuels semblent donc se passer comme ceux d'autrefois. Peut-être même sont-ils sous la dépendance d'espèces microbiennes identiques, qui se seraient alors perpétuées dans

(1) Miller, Der Einfluss der Microorganismen auf die Carie der Zähne (*Arch. für experimentelle Pathologie*, XVI, 1882).

(2) Van Tieghem, Sur le ferment butyrique (*Bacillus amylobacter*) à l'époque de la houille (*C. R. de l'Acad. des sc.*, 1879, t. LXXXIX, p. 1102).

(3) Renault, Bactéries des temps primaires (*Bull. du Muséum d'hist. nat.*, I, 1895). — Bactéries fossiles (*C. R. de l'Acad. des sc.*, CXX, 1895, p. 162; 1896, p. 953). — Bactériacées de la houille et des lignites (*Ibid.*, CXXIII, CXXIV, 1897, p. 1315; CXXVI, 1898, p. 1828). — Recherches sur les Bactériacées fossiles (*Ann. des sc. nat.*, *Bot.*, 1896, II, p. 175).

la longue série des âges sans subir de modifications. Ce sont là, il faut le reconnaître, des faits qui ne plaident guère en faveur du transformisme.

4. RÔLE DES BACTÉRIES DANS LA NATURE

D'une façon générale, les Bactéries sont des agents de simplification moléculaire. Ce sont les grands modificateurs de la matière organique morte, des substances usées par la vie des êtres plus élevés, animaux ou plantes, toutes substances qui, sans eux, seraient immobilisées dans cet état sans possibilité de retour dans un circuit vital. Les Bactéries décomposent ces produits, souvent complexes, en des composés plus simples dont les principaux sont l'acide carbonique et l'ammoniaque, facilement assimilables par les végétaux à chlorophylle ; elles sont, sous ce rapport, les compléments obligés de l'énergie solaire. Les plantes vertes, organismes de synthèse, réédifient, avec les matériaux simples qu'elles peuvent utiliser, de nouvelles molécules complexes, matières grasses, hydrocarbonées, albuminoïdes, qui peuvent alors servir d'aliment à l'animal. Celui-ci utilise ce qu'il y peut prendre d'énergie et rejette le reste sous une forme inutilisable pour la plante et l'animal. La matière fixée par le développement de la plante ou de l'animal doit aussi être modifiée; elle est sous forme solide, insoluble en partie dans l'eau, toujours impropre à nourrir un végétal. Les éléments utilisables existant dans le monde, ne se renouvelant pas puisqu'ils resteraient fixés, seraient bien vite usés, la vie deviendrait impossible. C'est cette solubilisation, cette désagrégation, ce retour à des formes simples, utilisables pour la plante, qui sont opérés, d'une façon on peut dire exclusive, par la vie microbienne.

Ce rôle d'agents de décomposition au premier chef peut faire penser que la véritable fonction des Bactéries dans la statique du monde vivant est d'être des organismes *saprophytes* (σαπρος, putride ; φύτον, plante), s'attaquant à la matière organique morte ; leurs autres fonctions seraient secondaires et acquises. En particulier, les espèces actuellement pathogènes se seraient adaptées à la vie parasitaire ; les unes incomplètement, pouvant encore jouer le rôle ordinaire et ne vivant en parasites que par occasion; les autres complètement ou à peu près, tellement leur adaptation a été parfaite et parce qu'elles ne retrouvent que bien difficilement dans le milieu extérieur les conditions de vie qu'elles se sont rendues nécessaires.

On verra du reste plus loin que des microbes pathogènes vrais semblent pouvoir revenir au type de saprophytes purs, en perdant toute action pathogène appréciable. D'autre part, les expériences de Charrin et de Nittis (1), celles plus récentes de Vincent (2) permettent d'admettre que des saprophytes avérés, types, peuvent, dans des conditions favorables, commencer à s'adapter à la vie parasitaire et acquérir un pouvoir pathogène indéniable. D'ailleurs, bien des espèces, tenues comme uniquement saprophytes, forment des produits nuisibles, véritablement toxiques, agissant ainsi comme les espèces parasites reconnues et formant un lien, une transition toute naturelle entre les deux groupes.

(1) Charrin et de Nittis, Un *Bacillus subtilis* pathogène (*Soc. de Biol.*, 17 juillet 1897).

(2) Vincent, Sur les aptitudes pathogènes des microbes saprophytes (*Ann. de l'Inst. Pasteur*, XII, 1898, p. 785).

PREMIÈRE PARTIE

MORPHOLOGIE ET BIOLOGIE GÉNÉRALES DES BACTÉRIES

CHAPITRE PREMIER

MORPHOLOGIE DES BACTÉRIES

1. FORMES

Les cellules qui constituent le corps des Bactéries, leur *thalle*, pour parler le langage des botanistes, affectent trois formes fondamentales :

1° Tantôt ce sont des sphères, plus ou moins régulières, parfois s'étirant suivant un diamètre pour devenir ovoïdes ou ellipsoïdes. Ces formes sont nommées *Micrococcus*, nom choisi comme générique, ou, d'un terme moins spécial, *Coccus* (fig. 1 ; *1*, *2*, *3*, *4*, *5*).

2° Si la longueur l'emporte sur la largeur, on a des *bâtonnets*. Lorsque la première de ces dimensions excède peu la seconde, ce sont de courts cylindres qui donnent même des figures ovales lorsque leurs extrémités sont régulièrement arrondies (fig. 1 ; *6*). Quand la longueur atteint un petit nombre de fois la largeur, c'est la forme de bâtonnets proprement dits ou de *bacilles* (fig. 1 ; *7*). Dans ce cas, le bâtonnet peut être de grosseur régulière d'un bout à l'autre, ou être renflé à une extrémité en forme de têtard de grenouille, ou en son milieu de manière à figurer un fuseau plus ou moins régulier. La production de ces renflements est toutefois un fait spécial, que nous verrons dépendre souvent, dans les cas normaux, de la formation de la spore. La longueur peut l'emporter un grand nombre de fois sur la largeur : c'est la forme de *filaments* (fig. 1 ; *11*).

3° Tantôt, enfin, ce sont des filaments plus ou moins courbés. Ils peuvent ne former simplement qu'une portion de circonférence : ce sont les formes en *Virgule* (Komma), plusieurs espèces de l'ancien genre *Vibrio* ; ou constituer une vraie spirale à tours plus ou moins nombreux, plus ou moins serrés (fig. 1 ; *12*, *13*) ; ce sont les formes désignées comme *Spirillum* et *Spirochæte*. Le nom de *Spiruline* était réservé pour les filaments courbés se repliant de façon à doubler leurs tours. Cette dernière disposition paraît par trop accidentelle pour qu'on lui conserve une importance aussi grande ; beaucoup de Bacilles, les *Bacillus mesentericus ruber* et *vulgatus*, le *Bacillus anthracis*, présentent, dans des vieilles cultures, des filaments en cordes, en tresses, en nattes, sans qu'on puisse donner quelque importance à cette forme.

Les premiers observateurs ont tiré de la forme des Bactéries des distinctions de grande importance pour la division en genres et en espèces. C'est encore jusqu'ici le caractère qui semble primer les autres, quoiqu'on le sache aujourd'hui beaucoup moins immuable qu'on le supposait être autrefois; c'est lui qui sert de base à beaucoup de classifications proposées.

Jusque dans ces derniers temps, il était admis qu'une espèce donnée ne pouvait présenter, dans le cours de son existence, qu'une des formes ci-dessus désignées, à l'exclusion absolue des autres. Cette opinion a été fortement battue en brèche, lorsqu'on est arrivé à prouver que certaines espèces pouvaient, selon les circonstances de milieu ou la phase de leur cycle évolutif, donner tantôt des cellules sphériques, des *Coccus*, tantôt des filaments droits, tantôt des filaments spiralés.

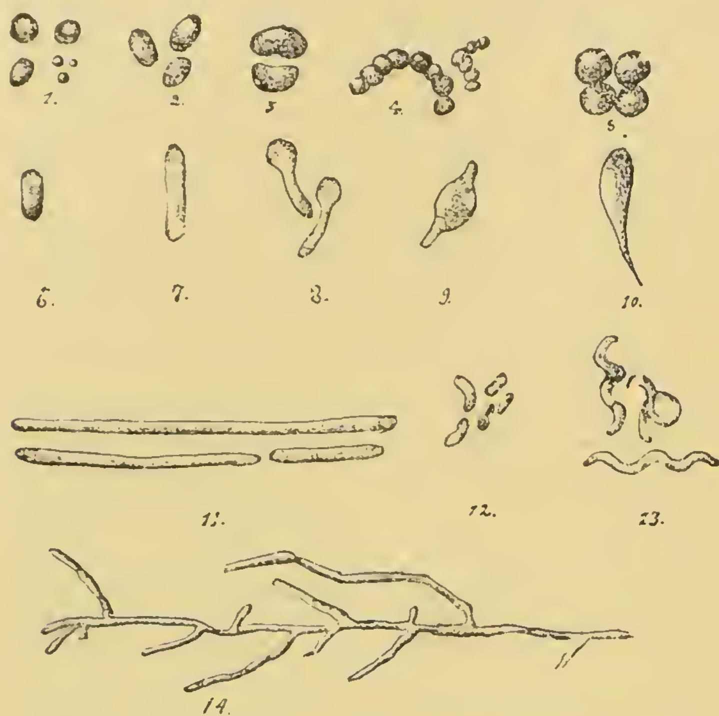


Fig. 1. — Forme des Bactéries en général.

1, *2*, *3*, *4*, *5*, Coccus de différentes formes et grosseurs ; *6*, court bâtonnet ; *7*, long bâtonnet ; *8*, *9*, formes renflées; *10*, forme en massue; *11*, filament; *12*, formes en virgules; *13*, formes spiralées; *14*, filament ramifié.

Dès lors, la valeur du caractère fut niée, avec acharnement même, par des observateurs comme Naegeli (1), qui n'admettait aucune distinction possible entre ces cellules qui pouvaient, selon les conditions d'existence, revêtir les formes les plus diverses et provoquer toutes les fermentations ou toutes les maladies infectieuses.

Il est cependant une condition essentielle, qui fait que ces variations de formes observées ne peuvent avoir la valeur générale qu'on leur prête : c'est qu'elles ne se produisent que lorsqu'on les provoque pour ainsi dire expérimentalement, en faisant vivre les éléments étudiés dans des conditions spéciales, qui souvent semblent nettement anormales pour un observateur non prévenu. C'est certainement la condition qui ressort des principaux travaux cités à l'appui de la théorie, en particulier d'un important mémoire de Wasserzug (2) sur le *Micrococcus prodigiosus* et des observations de Guignard et Charrin sur le *Bacille pyocyanique* (3). D'ailleurs, fait non moins précieux, dès qu'on place des éléments modifiés par les influences précédentes dans des conditions qui semblent normales pour eux, la forme typique reparaît.

Les preuves à l'appui de la théorie de la *variabilité des formes* ou du

(1) Naegeli, Untersuchungen über niederen Pilze, 1878.

(2) Wasserzug, Variations durables de la forme et de la fonction chez les Bactéries *Ann. de l'Inst. Pasteur*, 1888, n° 3).

(3) Guignard et Charrin, Sur le polymorphisme des Microbes (*Journ. de méd.*, 1888). Et : Charrin, La maladie pyocyanique, 1889.

pléomorphisme ou *polymorphisme* des Bactéries ne manquaient pas, disait-on. Un de ses partisans, Zopf (1), en citait d'excellentes.

Cohn (2) avait décrit sous le nom de *Cladothrix dichotoma* une Bactérie filamenteuse abondant souvent dans les eaux impures, dont les filaments, se ramifiant par poussée latérale, ont une apparence toute spéciale (fig. 2). Zopf, en étudiant le développement complet de cette

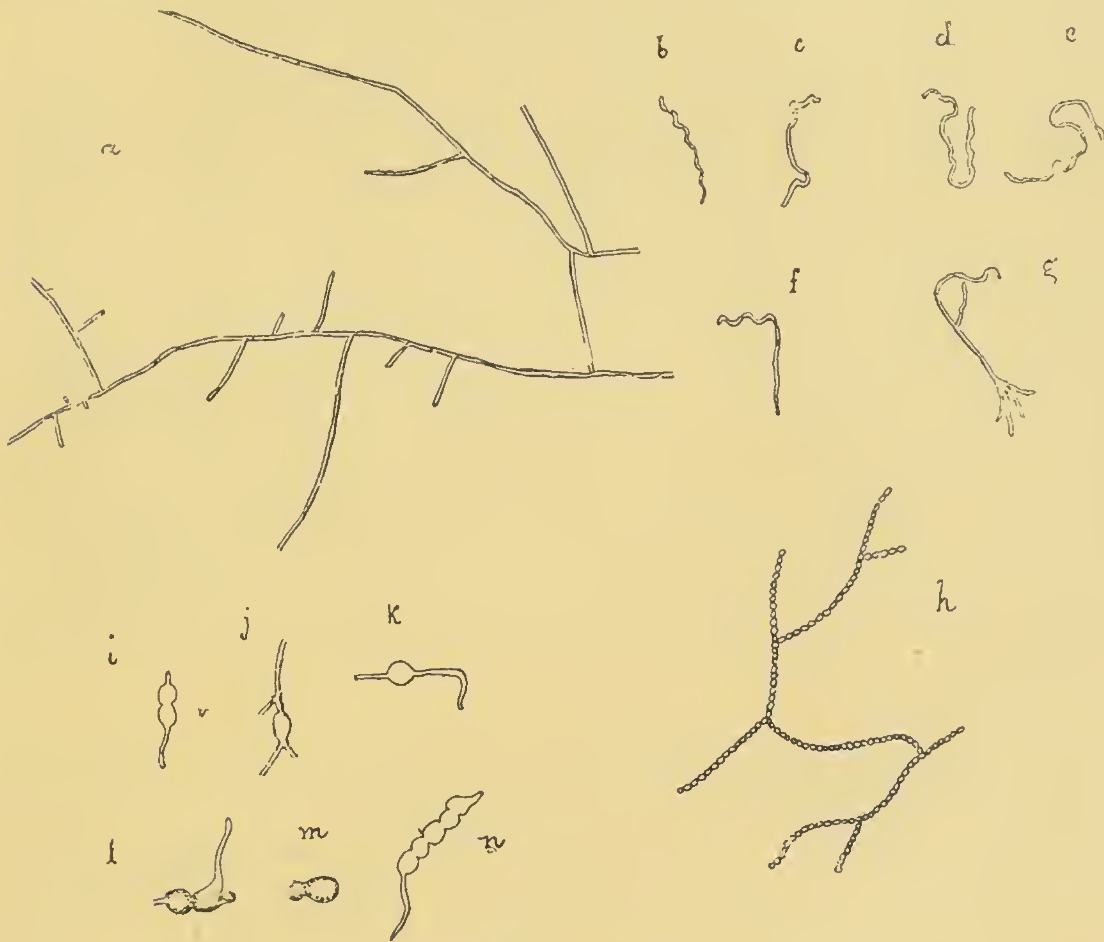


Fig. 2. — Différentes formes d'un *Cladothrix*, 900/1.

a, portion de filament ramifié ; *b*, *c*, *d*, *e*, *f*, *g*, parties de filaments diversement contournés ; *h*, filament segmenté en spores ; *i*, *j*, *k*, *l*, *m*, *n*, formes anormales (formes d'involution).

espèce, a cru pouvoir lui rattacher toute une série de formes arrondies, en courts bâtonnets, en filaments courbés et spiralés, qui avaient été considérées jusqu'alors comme autant de types spécifiques distincts.

Le même observateur (3), étudiant les organismes connus sous le nom de *Beggiatoa*, y signalait un cycle de formes des plus variées. Une cellule sphérique, un *Coccus*, pouvait, selon lui, d'après les conditions d'existence, s'allonger en une forme filamenteuse, ou se segmenter suivant diverses directions pour former des colonies planes ou massives ou enfin produire des formes mobiles en tout semblables aux êtres désignés sous le nom de *Monades*.

(1) Zopf, Die Spaltpilze. Breslau, 1885.
(2) Cohn, Untersuchungen über Bacterien (*Cohn's Beitr. zür Biol. der Pflanzen*, 1, 3e p., p. 141).
(3) Zopf, Zur Morphologie der Spaltpflanzen, 1883.

Les belles recherches de Winogradsky (1) ont démontré avec toute certitude que Zopf, en observant les *Beggiatoa*, avait confondu dans un même type toute une série de formes ayant entre elles des caractères de ressemblance certains, mais appartenant à des espèces sûrement distinctes les unes des autres.

La morphologie des *Cladothrix* n'apporte pas plus de preuves à l'appui de la théorie du pléomorphisme. Il n'est certes guère possible de considérer comme des Bactéries spiralées, des *Spirilles*, les portions de filaments ondulées ou même assez régulièrement spiralées qui se rencontrent fréquemment sur les parties terminales des rameaux. Ces portions peuvent bien s'isoler, mais tout autre morceau de filament peut le faire aussi : d'après mes observations, elles ne présentent jamais d'apparence de mobilité et n'ont du reste jamais l'aspect des véritables Spirilles (fig. 2 ; *b*, *c*, *d*, *e*, *f*, *g*). Quant à la production d'articles en courts bâtonnets, d'articles arrondis, de coccus, elle est réelle, mais se rattache intimement aux phases normales de la reproduction dans le type dont il est question. Or, il faut avouer que cette espèce peut revêtir dans le courant de son cycle évolutif, comme beaucoup d'autres formes spécifiques vivantes du reste, des états successifs divers sans perdre pour cela son individualité. De plus, Zopf n'a pas fait ses observations sur des cultures pures, mais au contraire à l'aide de matériaux, eau de marais putréfiée, qui contenaient certainement bien des espèces différentes.

On se trouve tout à fait en droit d'affirmer, avec Winogradsky, qu'on n'a cité jusqu'à présent aucun cas de pléomorphisme vrai chez les Bactéries.

C'est à cette opinion que se rattache actuellement aussi Guignard (2) qui, à la suite d'expériences faites sur le *Bacille pyocyanique* avec Charrin (3), s'était pleinement rallié aux idées de polymorphisme. Ces savants, additionnant les milieux de cultures d'antiseptiques divers, en proportions insuffisantes pour entraver complètement le développement du microbe, observaient des modifications de forme très variées et souvent profondes. Il était évident que les conditions d'existence tout à fait anormales dans lesquelles la Bactérie se trouvait placée étaient surtout à mettre en jeu, et que les modifications obtenues ne pouvaient être considérées que comme très secondaires ; la meilleure preuve en est le retour complet et rapide à la forme normale dès que de tels éléments, modifiés tératologiquement, se trouvent placés dans un milieu habituel. Jusqu'ici, malgré tout, on est bien forcé de reconnaître qu'on n'a pas encore apporté de preuve certaine à l'appui de la variabilité des types des espèces microbiennes (4).

Certaines espèces présentent, dans des conditions mal déterminées encore, mais qui paraissent défavorables, à des endroits variables de leurs éléments, des renflements de formes et de dimensions très variables (fig. 3). On considère ces changements de forme comme des états

(1) Winogradsky, Zur Morphologie und Physiologie der Schwefelbacterien. 1888. — Id., Sur le pléomorphisme des Bactéries (*Ann. de l'Inst. Pasteur*, 1889, n° 5).

(2) Guignard, Traité de pathologie générale de Bouchard, t. II, p. 56 et suiv.

(3) Guignard et Charrin, Sur les variations morphologiques des microbes (*C. R. de l'Acad. des sc.*, 5 décembre 1887).

(4) Rodet, De la variabilité dans les microbes. Paris, J.-B. Baillière, 1894.

pathologiques; les auteurs allemands les désignent sous le nom de *formes d'involution*. Ces monstruosités seraient un résultat direct de défaut de nutrition. Elles s'observent communément chez beaucoup d'espèces. D'après Hansen (1), les bâtonnets de la *Mère de vinaigre* (*Bacillus aceti*), quand leur liquide nutritif s'épuise, se renflent d'une façon très irrégulière et donnent des formes en fuseaux, en biscuits, en



Fig. 3. — Formes d'involution.

1, chez le *Streptocoque pyogène*; 2, chez le *Proteus mirabilis* (Hauser); 3, chez le *Spirille du choléra* (Van Ermenghem); 4, chez le *Bacillus anthracis* (Büchner); 5, chez le *Bacillus subtilis* (Büchner); 6, chez le *Bacillus aceti* (Hansen).

bouteilles (fig. 3; 6). Büchner (2) a montré que de semblables formes apparaissent chez les *Bacillus subtilis* et *Bacillus anthracis* (fig. 3; *4* et 5) quand, dans le liquide où l'on cultive ces espèces, la proportion des matières sucrées est trop forte pour celle de matière azotée, ce qui prouverait bien que ces variations sont occasionnées par la nutrition défectueuse. Les variations du *Bacille pyocyanique* dont il a été question plus haut sont probablement de même nature.

Ce qui semble clairement résulter de ceci, c'est qu'il faut d'abord distinguer, chez les êtres, la forme de l'élément actif; c'est la bonne, la

(1) Hansen, Contribution à la connaissance des organismes qui peuvent se trouver dans la bière et le moût de bière et y vivre. Copenhague, 1879.

(2) Büchner, Beitrage zur Morphologie der Spaltpilze (*Naegeli's Unters. über niederen Pilze*, 1882, p. 205).

vraie, paraissant constante ou à peu près. Puis, mais secondairement, les formes des éléments modifiés dans une voie quelconque, paraissant anormales, peut-être des formes de dégénérescence (formes d'involution, etc.). On doit attribuer nécessairement aux formes de ces dernières catégories une importance bien moindre.

Les bâtonnets et les filaments ne paraissent pas posséder de parties antérieure et postérieure différenciées : les deux extrémités sont la plupart du temps identiques.

Les *dimensions* des Bactéries sont d'ordinaire fort restreintes. Les espèces sphériques ont un diamètre qui oscille entre 0 µ 3 et 2 µ. Les espèces en bâtonnets ou en filaments ont une épaisseur qui peut varier dans les mêmes limites ; la longueur est souvent de deux à dix fois la mesure de l'épaisseur. Les filaments de certaines espèces peuvent atteindre une très grande longueur sans présenter de segmentation, apparente au moins.

Parmi les espèces de très petites dimensions, on peut citer le *Bacille de Pfeiffer* qui mesure souvent moins de 0 µ 5 de long, les *Nitrobacter* de Winogradsky, de 0 µ 5 de long sur 0 µ 2 de large, le *Micrococcus de la mammite gangreneuse de la brebis* qui n'a guère que 0 µ 2 de diamètre. Or, avec les meilleurs objectifs, on n'arrive plus à distinguer de corpuscules de moins de 0 µ 1, et il n'y a aucune raison pour que les dimensions des microbes s'arrêtent à cette dernière mesure. On est forcé d'admettre qu'il doit en exister de nombreux peut-être qui nous sont tout à fait *invisibles* avec les appareils habituels (1). Ces microbes traversent les bougies filtrantes en terre poreuse, d'où le nom de *Microbes filtrants* (2), apparaissent à l'ultramicroscope comme de très fines granulations brillantes animées de mouvements très nets, dont il est impossible de déterminer ni la forme ni les dimensions. Les preuves physiques et physiologiques permettent d'affirmer leur existence (3).

C'est ce qu'ont démontré les recherches de Nocard et Roux (4) sur la *péripneumonie bovine* ; dans la sérosité qui infiltre le tissu pulmonaire il existe des microbes d'une ténuité telle qu'il n'est pas possible, avec les meilleurs objectifs, même avec les méthodes de coloration, d'en déterminer ni la forme ni les dimensions ; on n'aperçoit qu'une très fine poussière colorée, sans pouvoir isoler d'élément. La pullulation, dans les milieux de culture appropriés, se manifeste par la production d'une légère opalescence.

D'après les recherches de Lœffler et Frosch (5), le microbe de la *fièvre aphteuse* serait aussi de ces espèces ; de même le microbe de la *peste aviaire* observée au Tyrol par Lode et Gruber (6)

(1) Roux, Sur les microbes dits *invisibles* (*Bull. de l'Inst. Pasteur*, I, 1903, p. 7).
(2) Remlinger, Les microbes filtrants (*Ibid.*, IV, 1906, p. 337).
(3) Charveau, Les microbes pathogènes invisibles et les preuves physiques de leur existence (*Acad. des sc.*, 26 avril 1909).
(4) Nocard et Roux, Le microbe de la péripneumonie (*Ann. de l'Inst. Pasteur*, 1898, XII, p. 240).
(5) Lœffler et Frosch, Maul-und Klauenseuche (*Centralbl. für Bakt.*, I Abth., XXIII, 1898, p. 371).
(6) Lode et Gruber, Bakteriologische Studien über die Aetiologie einer epidemischer Erkrankung der Hühner in Tirol (*Ibid.*, XXX, 1901, p. 593).

et en Italie par Centanni (1), étudié depuis par Giemsa et Prowazek (2).

De nombreuses autres maladies paraissent encore causées par de tels microbes invisibles. C'est la *myxomatose du lapin* observée par Sanarelli (3); la *horse sickness*, qui sévit sur les chevaux dans l'Afrique du Sud (4): l'*épithélioma contagieux* des oiseaux (5). C'est la *fièvre jaune*, comme l'ont démontré, à Cuba, Reed, Carrol et Agramonte (6); la *clavelée* du mouton, d'après Borrel (7); la *vaccine*, pour Paschen (8), Negri (9), Remlinger (10), Volpino (11); la *rage*, d'après les expériences de Di Vestea (12) et Bertarelli (13). C'est l'*acné varioliforme* de Bazin, d'après Juliusberg (14); l'*agalassie contagieuse* des brebis et des chèvres, d'après Celli et Blasi (15); la *fièvre catarrhale du mouton*, du sud de l'Afrique (16); l'*anémie pernicieuse du cheval*, si meurtrière dans nos pays, d'après Carré et Vallée (17); la *maladie des jeunes chiens*, pour Carré (18), où la *Pasteurella* décrite comme agent pathogène ne serait qu'un microbe d'infection secondaire. Peut-être, pour le *hog-choléra*, le Bacille décrit ne serait aussi qu'un microbe secondaire, l'agent spécifique rentrant dans la catégorie de ces microbes invisibles, comme le feraient penser les expériences de Dorset, Bolton et Bryde (19)

(1) Centanni, Die Vogelpest (*Centralbl. für Bakt.*, Originale, XXXI, 1902, p. 145).

(2) Giemsa et Prowazek, Weitere Untersuchungen über sogenante ultramikroskopische Infektionserreger. Zur Filtration des Hühnerpestvirus (*Münchener mediz. Wochenschr.*, 1908, p. 1524).

(3) Sanarelli, Das myxomatogene Virus. Beitrag zum Studium der Krankheitserreger ausserhalb des Sichtbaren (*Centralbl. für Bakt.*, XXIII, 1898, p. 865).

(4) Mac Fadyean, African horse-sickness (*Journal of comparative Pathology*, XIII, 1900, p. 1). — Edington, South African horse-sickness (*Ibid.*, XIII, 1900, p. 200).

(5) Marx et Sticker, Untersuchungen über das Epithelioma contagiosum des Geflügels (*Deutsche med. Wochenschr.*, 1902, n° 50, et 1903, n° 5).

(6) Reed et Carroll, The etiology of yellow fever (*American Medecine*, 22 février 1902).

(7) Borrel, Expériences sur la filtration du virus claveleux (*Soc. de Biol.*, 18 janvier 1902).

(8) Paschen, Was wissen wir über den Vaccineerreger (*Munch. mediz. Wochenschrift*, 1906, p. 291).

(9) Negri, Ueber Filtration des Vaccinevirus (*Zeitschr. für Hygiene*, LIV, 1906, p. 327).

(10) Remlinger et Osman Nouri, Sur le passage du virus vaccinal à travers la bougie Berkefeld (*Soc. de Biol.*, 27 mai 1905).

(11) Volpino, Ulteriori ricerche sui corpuscoli mobili del vaccine (*Riv. di Igiene*, XIX, 1908).

(12) Di Vestea, De più recenti studii circa la natura del Virus rabido (*Giorn. ital. di Soc. med.*, 1903, n°s 6 et 7).

(13) Bertarelli et Volpino, Experimentelle Untersuchungen über die Wut. Filtration des Strassenvirus und Erschöpfung des Virus durch die Filter (*Centralbl. für Bakt.*, Originale, XXXVII, p. 51).

(14) Juliusberg, Zur Kenntniss des Virus des Molluscum contagiosum des Menschen (*Deutsche med. Wochenschr.*, 5 octobre 1905).

(15) De Blasi, *Ann. d'Igiene sperimentale*, 1904.

(16) Thisler, Maladies des troupeaux dans l'Afrique du Sud (*Bull. de l'Inst. Pasteur*, III, 1905, p. 617).

(17) Carré et Vallée, *C. R. de l'Acad. des sc.*, 26 juillet et 26 décembre 1904, 14 août 1905).

(18) Carré, Sur la maladie des chiens (*C. R. de l'Acad. des sc.*, 6 mars et 29 mai 1905).

(19) Dorset, Bolton et Bryde, Etiology of hog-cholera (*United States Dep. of Agriculture Animal. Industry*, Bull. 72, 1905). — Hübener, Ist der Bacillus suipestifer der Erreger der Schweinpest oder nicht? (*Centralbl. für Bakt.* Originale, XLVII, p. 586).

et de Hübener. C'est encore, pour Doerr (1), les agents des maladies des pays chauds désignées sous les noms de *dengue*, *fièvres estivales*, *fièvres d'insolation*; celui du *trachome* pour Bertarelli (2), de la *variole* pour Prowazek (3), des *oreillons* pour Granata (4), de certaines formes de *diphtérie aviaire* pour Dean et Marshall (5). Enfin, des recherches de Flexner (6) semblent faire aussi rentrer dans cette catégorie de maladies les poliomyélites aiguës de l'enfance.

D'un autre côté, il est des Bactéries qui atteignent de grandes dimensions. La plus grande des espèces connues, le *Bacillus Bütschlii* de Schaudinn, a de 50 à 60 μ, parfois 80 μ de long, sur 3 à 6 μ de large, et pourrait presque être visible à l'œil nu.

2. STRUCTURE

Les formes élémentaires des Bactéries ont été nommées *cellules* et considérées comme telles avant qu'on ait pu avoir des notions suffisantes sur leur structure. Leur mode d'accroissement rappelait celui de bien des cellules végétales ; ce fut une raison pour les en rapprocher.

Bien qu'ayant suscité, depuis le début presque des études microscopiques, un très grand nombre de travaux, la question de la structure de ces êtres reste encore aujourd'hui fort obscure et très controversée. Elle est cependant de la plus haute importance, en raison surtout des rapprochements à faire avec d'autres groupes et de la place qu'on doit leur attribuer dans la systématique.

En examinant au microscope, même à de très forts grossissements, des Bactéries bien vivantes, sans faire intervenir aucun réactif ni prendre des cellules altérées ou trop vieilles, la structure paraît être des plus simple. Les éléments, coccus ou bâtonnets, sont de petits corps hyalins, semblant tout à fait homogènes. Ce n'est qu'avec certaines espèces, à éléments de grandes dimensions, qu'un examen direct attentif peut faire constater l'existence de fines granulations à l'intérieur. Pour les autres, quand on y veut distinguer quelques détails, il faut faire intervenir des conditions spéciales, employer des réactifs colorants, modifier l'élément par une action quelconque. Mais aussi l'on ne peut plus être certain de n'avoir pas changé la véritable structure, que les formes vues ne sont pas des modifications provoquées par les réactifs employés, des aspects en quelque sorte artificiels, même cadavériques.

A l'aide de certains artifices de préparation, en particulier de réactifs colorants ou fixateurs, ou tout au moins pouvant contracter le proto-

(1) Doerr, Ueber ein neues invisibles Virus (*Berl. klin. Wochenschr.*, 12 octobre 1908).

(2) Bertarelli et Cecchetto, Beitrage zur Aetiologie des Trachoms (*Centralbl. für Bakt.*, Originale, XLVII, p. 432).

(3) Prowazek et de Beaurepaire-Aragao, Untersuchungen über die Variola (*Munch. med. Wochenschr.*, 3 novembre 1908).

(4) Granata, Sulla etiologia degli orecchioni da virus filtrabile. Cagliari, sept. 1908 (An. in *Bull. de l'Inst. Pasteur*, VI, 1908, p. 1093).

(5) Dean et Marshall, Observations indicating that the recent outbreak of diphteria in the wood-pigeon (*Columba palumbus*) is caused by a « filter-passer » (*Journ. of Path. and Bacter.*, XIII, juillet 1908, p. 29).

(6) Flexner, *Journal of the American Association*, 13 nov., 4 déc. et 18 déc. 1909.

plasme, il devient possible de constater des particularités de structure intéressantes. On peut se rendre compte que ces éléments sont formés d'une masse protoplasmique entourée d'une membrane.

Membrane. — La *membrane*, chez quelques grosses espèces à contenu finement granuleux, peut se distinguer sans artifice de préparation, à un très fort grossissement, comme un mince liséré à double contour Beaucoup plus souvent, elle se confond complètement avec le contenu dont elle a la réfringence. On ne l'aperçoit bien qu'après avoir contracté le contenu cellulaire par un réactif approprié. La chaleur, l'alcool absolu peuvent servir. Fischer (1) recommande, pour l'observer facilement, de mettre en œuvre la *plasmolyse*, de déterminer par osmose une contraction du protoplasme en faisant agir sur les cellules une solution saline, contenant une matière douée d'un pouvoir osmotique plus con-



Fig. 4. — *Bacillus oxalaticus.*

A droite, éléments normaux avec vacuole centrale et débuts de la division : à gauche, éléments ayant subi la plasmolyse (d'après Migula).

sidérable que le suc cellulaire, par exemple une solution de salpêtre à 5 p. 100 ou de sel marin à 2,5 p. 100. On voit alors le contenu se séparer nettement de la membrane et il devient possible de délimiter nettement ce qui appartient à cette dernière. Les réactifs colorants, en imprégnant différemment chacune de ces parties, peuvent donner le même résultat.

On peut arriver à produire des modifications identiques, les mêmes phénomènes de plasmolyse, en faisant vivre certaines espèces dans des conditions spéciales, aux dépens de milieux particuliers. Podwyssotzky et Taranoukhine (2) ont observé d'une façon très nette les phénomènes de plasmolyse chez la *Bactéridie charbonneuse* en cultivant cette espèce à 42°-43° dans des milieux contenant de la matière cérébrale broyée et des peptones ; le corps actif serait la lécithine.

Cette membrane est tantôt mince, tantôt plus ou moins épaisse. Dans ce dernier cas, il est le plus souvent possible de lui reconnaître deux couches (3) : une interne, mince, transparente, qui semble être la vraie membrane; l'autre externe, moins bien délimitée, plus épaisse, comme gélatineuse, parfois peu visible, d'autres fois très évidente. Künstler et Busquet (4) proposent de nommer cette dernière *couche gélatineuse* et l'interne *couche cuticulaire*.

Suivant ces derniers observateurs, la couche gélatineuse ne serait pas complètement homogène, mais présenterait « des stries transver-

(1) Fischer, Untersuchungen über Bakterien (*Jahrb. für wiss. Bot.*, XXVII, 1894). Et : Vorlesungen über Bakterien. Iéna, 1897.

(2) Podwyssotzky et Taranoukhine, Contribution à l'étude de la plasmolyse chez les Bactéries (*Ann. de l'Inst. Pasteur*, 1898, XII, p. 501).

(3) Traité pratique de Bactériologie, 1re édition, 1889, p. 19.

(4) Künstler et Busquet, Observations sur la structure des Bactériacées et des organismes voisins. Bordeaux, 1897.

sales d'une finesse et d'une légèreté des plus extrêmes, qui pourraient être interprétées comme l'expression d'une série longitudinale d'alvéoles ». Cette couche gélatineuse provient probablement d'une différenciation particulière des zones périphériques de la couche cuticulaire sous-jacente qui acquièrent le pouvoir d'absorber de l'eau et de se transformer en une sorte de gelée. C'est là un processus qui s'observe fréquemment dans les membranes cellulaires végétales, et particulièrement chez beaucoup d'Algues. Cette couche résiste d'habitude aux réactifs colorants, même les plus diffusibles ; elle apparaît comme un liséré hyalin, une sorte d'auréole claire autour des éléments colorés. Son degré de diffluence varie selon l'espèce d'abord et ensuite le milieu où elle se trouve. Elle peut mesurer une épaisseur relativement considérable ; le corps cellulaire paraît alors noyé dans la masse de gelée qui l'entoure.

Les formations décrites sous le nom de *capsules* ne sont qu'une exagération, un grand développement de cette couche gélatineuse. Un assez grand nombre d'espèces en présentent d'une façon relativement constante dans des conditions déterminées. Parmi les mieux pourvues, à ce point de vue, se trouvent le *Pneumocoque*, le *Pneumobacille*. Chez d'autres, il y a une exagération plus marquée encore du même processus, qui devient alors plutôt une véritable sécrétion de matière gélatineuse, comme chez le *Bacterium pediculatum* isolé par Koch et Hosaeus (1) d'eaux de sucreries (fig. 5) et le *Bacterium vermiforme* trouvé par Marshall Ward (2) dans la bière de gingembre (fig. 7). D'autres, au contraire, montrent cette capsule très mince ou n'en ont jamais. Il est des procédés de coloration qui la mettent mieux en évidence (Voy. *Coloration des capsules*). Parfois, elle paraît inconstante, chez le *Bacille du charbon* par exemple, où je l'ai signalée en 1888, fait confirmé plus tard par Kern (3). La plupart des espèces à capsules ne les présentent que dans des conditions spéciales, surtout lorsqu'elles se développent dans l'organisme ou dans les milieux particuliers, comme le sérum liquide, parfois le lait. D'après Boni (4), certains procédés de préparation, la fixation dans un liquide glycéro-albumineux et la coloration successive à la fuchsine phéniquée et au bleu de Lœffler, permettraient de reconnaître l'existence d'une capsule chez toutes les Bactéries, cultivées sur tous les milieux, même solides. Les formations connues chez l'*Actinomyces* sous le nom de *massues* sont peut-être à rapprocher des capsules. L'origine de ces capsules ne paraît devoir faire aucun doute ; elles proviennent de la diffluence de la partie externe de l'enveloppe de la partie terminale des filaments.

Au-dessous de cette couche gélatineuse se trouve la *couche cuticulaire*, qui peut être considérée comme la vraie membrane. Elle est plus dense, plus réfringente et alors d'aspect plus sombre, plus résistante que la précédente. La plasmolyse la fait facilement distinguer du contenu pro-

(1) Koch et Hosaeus, Ueber einen neuen Froschlaich der Zuckerfabriken (*Centralbl. für Bakt.*, XVI, 1894).

(2) Marshall Ward, The Ginger-Beer plant and the organisms composing it (*Philosophical Transact. Royal Soc. London*, CLXXXIII, 1892).

(3) Kern, Ueber die Kapsel des Anthraxbacillus (*Centralbl. für Bakt.*, XXII, 1897, p. 166).

(4) Boni, Ricerche sulla capsula dei Bacteri (*Giorn. d. Soc. ital. d'igiene*, XXIII, 1901, p. 417).

toplasmique. Elle a d'ordinaire une épaisseur moindre que la couche gélatineuse. A de très forts grossissements, d'après Künstler et Busquet, elle montrerait des alternances plus claires et plus sombres, expression d'une structure alvéolaire. D'après les observations de Schaudinn sur le *Bacillus Bütschlii*, la membrane, sur des coupes optiques longitudinales, montrerait des espaces clairs et des points sombres et, vue de face, donnerait l'impression d'un réseau dont les mailles sont plus réfringentes et se colorent d'une façon plus intense (fig. 6).



Fig. 5. — *Bacterium pediculatum* (d'après Koch et Hosaeus).

La membrane, dans sa totalité, souvent rigide et dure, peut se montrer souple et très flexible : chez certaines espèces de Bactéries spiralées mobiles, elle suit en effet les ondulations si rapides de la masse protoplasmique.

Il est des cas où divers éléments peuvent s'entourer d'une enveloppe commune, dans des conditions peu déterminées encore. Doit-on accorder à cette enveloppe la simple valeur d'une membrane ou plutôt la regarder comme un kyste destiné à protéger les éléments qui l'ont produit ? La question est encore difficile à trancher. Des faits de ce genre se rencontrent chez les *Ascococcus* et les *Ascobacterium*, qui paraissent bien devoir être regardés comme de vraies Bactéries. Ceux décrits par Thaxter (1), et Zukal (2), chez les organismes qu'ils nomment *Myxobactéries*, paraissent être d'une complication plus grande et se rapprocher d'une véritable constitution d'une sorte de fruit, établissant plutôt des relations entre ces êtres et les Myxomycètes, comme le montrent surtout les observations de Quehl (3) et de Vahle (4). Il est difficile



Fig. 6. — Structure du *Bacillus Bütchslii* (d'après Schaudinn).

1, coupe longitudinale ; 2, portion de membrane séparée du cytoplasme ; 3, morceau de membrane, vue du dessus ; 4, moitié d'un bâtonnet (hématoxyline de Grenacher).

(1) THAXTER, On the Myxobacteriaceæ, a new order of Schizomycetes (*Botanical Gazette*, XVII, décembre 1892).

(2) ZUKAL, Myxobacterien (*Bericht. der deutschen bot. Gesellschaft*, 1897, p. 542).

(3) QUEHL, Untersuchungen über die Myxobakterien (*Centralbl. für Bakt.*, 2te Abth., XVI, 1906, p. 9).

(4) VAHLE, Vergleichende Untersuchungen über die Myxobakteriaceen (*Ibid.*, XXV, 1909, p. 178).

d'être plus affirmatif sur la nature et la signification de telles enveloppes.

La composition chimique de la membrane est peu connue. Il est trop difficile de l'isoler du restant de la cellule : d'autre part, les réactions microchimiques n'apprennent que peu de chose. Dans la grande majorité des cas, elle ne semble pas être formée de cellulose, ce qui éloignerait les Bactéries des Algues et des Champignons et les rapprocherait des Flagellés. De petites quantités de cellulose se trouveraient, d'après Bovet (1), dans un Bacille isolé d'un cas d'érythème noueux, chez le *Bacille tuberculeux* d'après Hammerschlag (2), chez le *Bacillus subtilis* d'après Dreyfuss (3) ; j'ai signalé la production de la réaction caractéristique de la cellulose, le bleuissement par l'acide sulfurique et l'iode ou par le chloro-iodure de zinc chez certains éléments de la

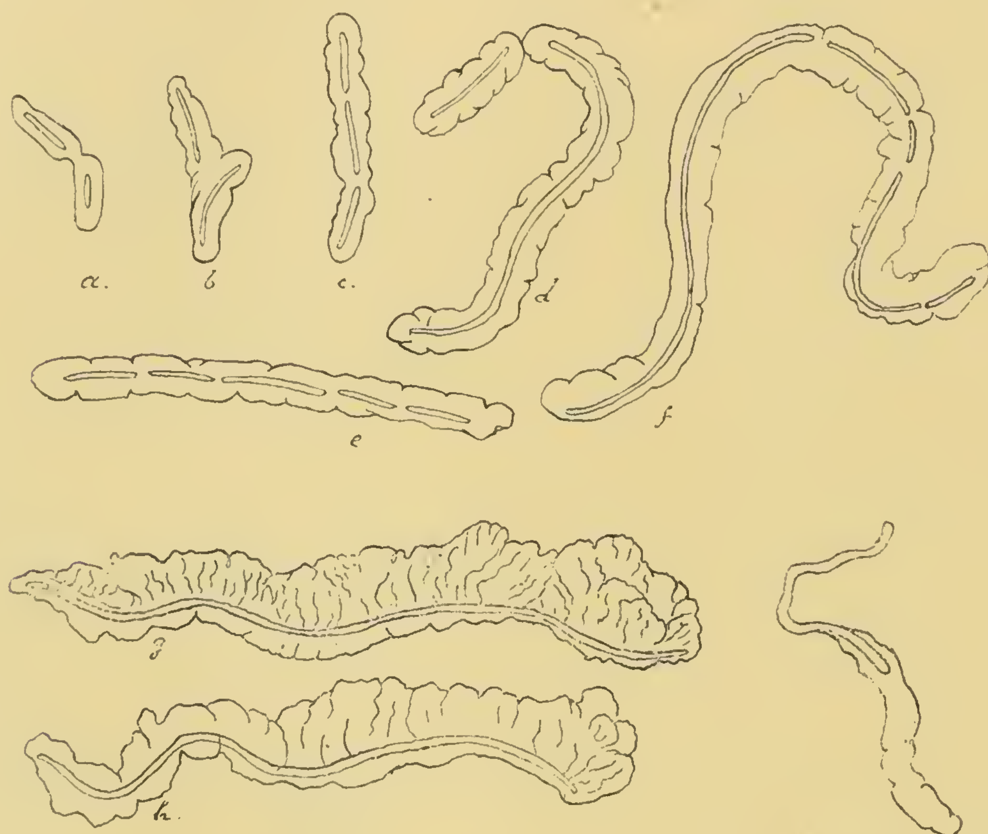


Fig. 7. — *Bacterium vermiforme* (d'après Marshall Ward).

Sarcina aurea : Suringar (4) l'avait observé également sur la *Sarcina ventriculi*, où Gruber (5) ne l'a pas rencontré. D'après Auclair (6), la matière unissante de la zooglée du *Bacille tuberculeux* présente les réactions des corps cellulosiques, résistant à la potasse à l'ébullition et se colorant en bleu par l'iode après action de l'acide sulfurique. D'après Neisser (7), la membrane du *Bacille du xérosis de la conjonctive*

(1) Bovet, Ueber die chemische Zusammensetzung der Bacillen des Erythema nodosum (*Monatshefte für Chemie*, IX, p. 1154).

(2) Hammerschlag, Bakteriologische-chemische Untersuchungen der Tuberkelbacillen (*Monatshefte für Chemie*, X, p. 9).

(3) Dreyfuss, Ueber das Vorkommen von Cellulose in Bacillen, Schimmel und anderen Pilzen (*Zeitschr. für physiol. Chemie*, XVIII, 1894, p. 358).

(4) Suringar, Ein Wort über den Zellenbau von Sarcina (*Bot. Zeit.*, 1866).

(5) Gruber, Die Arten der Gattung Sarcina (*Arb. aus den bakt., Inst. der techn. Hochschule zu Karlsruhe*, I, 1895).

(6) Auclair et Paris, Constitution chimique du Bacille de Koch et de sa matière unissante (*Acad. des sc.*, 4 février 1907).

(7) Neisser, *Deutsche med. Wochenschr.*, 1884, n° 21.

serait formée d'une matière grasse ; n'est-ce pas seulement *imprégnée* qu'il faudrait dire ?

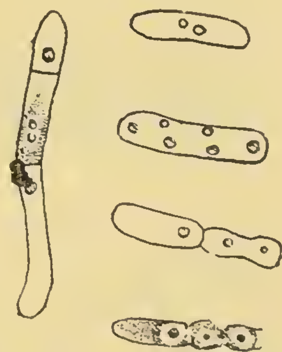
Pour la plupart des espèces étudiées à ce point de vue, la membrane serait un composé azoté. Nencki (1) a étudié une Bactérie de la putréfaction dont la membrane serait, pour une bonne partie, un composé albuminoïde, la *mycoprotéine*. D'après Vincenzi (2), la membrane du *Bacillus subtilis* serait un corps azoté sans trace de cellulose. Bütschli (3) considère aussi la substance de la membrane comme un composé albuminoïde, d'origine protoplasmique. Certaines particularités de coloration ou de réaction ont fait penser à la présence de *chitine* ou de composés voisins (4).

D'ordinaire, en effet, la membrane présente bien nettement les réactions des matières albuminoïdes. Elle se teint en particulier en rose par le réactif de Millon et se colore faiblement en jaune par l'iode ; elle se comporte vis-à-vis des couleurs d'aniline comme un albuminoïde. Elle résiste toutefois à la lessive de potasse étendue et aux solutions de pepsine et de trypsine, mais se dissout dans la lessive concentrée.

Chez quelques espèces qui vivent souvent dans les eaux ferrugineuses, des *Leptothrix* et des *Cladothrix* par exemple, la membrane, gélifiée ou non, peut être colorée, par l'oxyde de fer, en brun rouge sale ou en vert-olive.

Chez les Bactéries productrices de pigment, la membrane reste toujours incolore, au moins tant que la cellule est vivante ; elle peut se colorer après la mort, par diffusion ou dépôt du pigment.

La membrane contient certainement une petite quantité de composés minéraux ; il est difficile de déterminer ce qui lui revient dans la teneur en cendres du corps complet des Bactéries.


Fig. 8. — Bactéries du tartre dentaire du chien : 1200/1.

Protoplasma et noyau. — La structure du contenu cellulaire, ou *cytoplasme*, a paru longtemps des plus simple ; on en faisait une masse homogène, transparente, montrant à peine quelques granulations auxquelles on n'attribuait aucune importance. En étudiant, à de forts grossissements, les éléments bien vivants d'espèces de grande taille, et surtout en s'aidant de réactifs colorants ne paraissant pas nuire à la vie microbienne, dits *colorants vitaux*, comme une solution aqueuse diluée de vert de méthyle, le rouge neutre et, surtout, le bleu de méthyle, il est facile de reconnaître que leur contenu cellulaire n'a pas la transparence et l'homogénéité qu'on voulait lui attribuer. Il a, au contraire, un aspect nettement trouble et granuleux, et souvent on observe dans sa masse de grosses granulations plus brillantes, absorbant légèrement la matière colorante (fig. 8).

(1) Nencki, Beitrage zur Biologie der Spaltpilze (*Journ. für prakt. Chemie*, XIX, et XX).

(2) Vincenzi, Ueber die chemische Bestandtheile der Spaltpilze (*Zeitschr. für physiol. Chemie*, XI, p. 186, 1886).

(3) Bütschli, Ueber den Bau der Bakterien. Leipzig, 1890.

(4) Iwanof, Ueber die Zusammensetzung der Eiweisstoffe und Zellmembranen bei Bakterien und Pilzen (*Hofmeister's Beitrage zur chem. Physiologie und Pathologie*, I, 1902, p. 524).

Le nombre de ces sphères ne semble pas fixe, même pour une espèce donnée ; on peut n'en trouver qu'une ou deux, occupant des places variées ou situées au milieu d'un bâtonnet ; d'autres fois plusieurs, alors plutôt rapprochées de la membrane, formant des files longitudinales.

En employant des méthodes plus compliquées, surtout en faisant intervenir des réactifs fixateurs et colorants plus énergiques, il est possible d'arriver à observer plus de détails. Il est vrai que l'action des réactifs peut alors être pour quelque chose dans les aspects obtenus. Ces recherches ont suscité des travaux très nombreux ; les résultats signalés sont, en bien des points, différents, à tel point qu'on ne peut pas encore actuellement considérer ces questions de structure comme résolues.

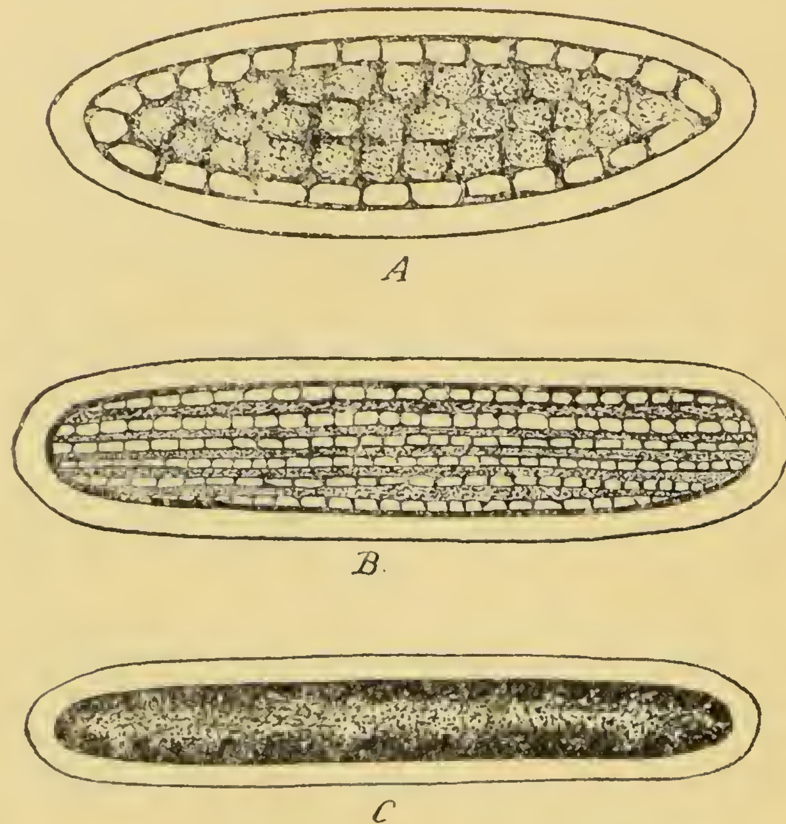


Fig. 9. — *Bacillus subtiliformis.*

A, coupe optique médiane ; B, vue superficielle ; C, couche cuticulaire à alvéoles sombres (d'après Künstler et Busquet).

On trouvera l'indication de tous ces travaux dans d'intéressants articles récents de Guillermond (1) et d'Amato (2).

Toutes les observations démontrent qu'il existe une différenciation bien marquée dans ce contenu cellulaire en apparence homogène, différenciation qui se traduit surtout par la manière d'agir à l'égard des réactifs colorants employés.

Immédiatement au-dessous de la membrane se trouverait une mince couche pariétale, *couche sous-cuticulaire* de Künstler (3), qui, pour Bütschli (4), serait le vrai protoplasma, non pas homogène, mais d'apparence réticulée ou formé d'alvéoles à forme de tonnelet (Künstler et Busquet). Le restant du contenu constituerait le *corps central* (Bütschli), à caractères autres, se distinguant surtout par son avidité

(1) Guillermond, La cytologie des Bactéries. Revue (*Bull. de l'Inst. Pasteur*, 1907). — Contribution à l'étude cytologique des Bacilles endosporés (*Arch. für Prötistenkunde*, 1908, XII, p. 9).

(2) Amato, Ueber die feine Struktur der Bakterien (*Centralbl. für Bakt.*, 1 Abth., Originale, XLIII, 1908, p. 385).

(3) Künstler, Contribution à la technique des Bactériacées (*C. R. de l'Acad. des sc.*, 1887, CV, p. 684). — Id., Recherches sur la morphologie des Flagellés (*Bull. scient. du Nord*, 1889, p. 456). — Künstler et Busquet, Observations sur la structure des Bactériacées et des organismes voisins. Bordeaux, 1898. — Id., Sur la valeur nucléaire du corps central des Bactéries (*C. R. de l'Acad. des sc.*, 1897, CXXV, p. 112).

(4) Bütschli, Ueber den Bau der Bacterien und verwandter Organismen. Leipzig, 1890.

pour beaucoup de colorants. La structure de cette partie serait également assez compliquée. Elle peut paraître très simple, tout à fait homogène. Ou bien elle montre une structure alvéolaire très nette, elle est formée d'une ou plusieurs files d'alvéoles souvent très régulières, fait déjà signalé par Künstler en 1886 pour le *Spirillum tenue*. La complication peut être ici plus ou moins grande ; dans les formes très simples, chez beaucoup de *Micrococcus* par exemple, ce corps central serait uni-alvéolaire ; chez d'autres, il se trouverait deux alvéoles ; chez les formes plus grandes et plus complexes, les alvéoles, plus ou moins nombreux, formeraient des files longitudinales simples ou multiples.

Les observations de Schaudinn sur le *Bacillus Bütschlii* confirment, sous ce rapport, les idées de Künstler. Le cytoplasme, dans cette espèce, montre une structure alvéolaire très nette (fig. 6, p. 21). On y observe un réticulum finement granuleux, délimitant des espaces remplis d'un liquide clair ; dans la trame du réseau, surtout aux nœuds des mailles, se trouvent des granulations plus grosses, absorbant fortement les matières colorantes.

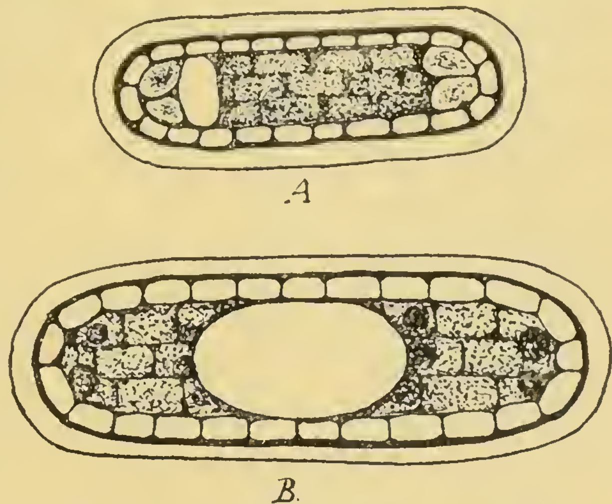


Fig. 10. — *Bacillus coli communis*.

A, coupe optique montrant le corps central et les extrémités clairs ; B, coupe optique montrant la vacuole centrale et des granulations disséminées (d'après Künstler et Busquet).

Beaucoup d'autres espèces, à éléments assez gros, laissent nettement reconnaître un tel cytoplasme à aspect général finement granuleux. Dans son intérieur se trouvent souvent des inclusions cellulaires de nature variée, surtout des vacuoles et des granulations sur la nature desquelles on est encore peu fixé (fig. 10, 11 et 12).

Les *vacuoles* sont fréquentes dans la masse protoplasmique. On peut en trouver une seule au centre, ou près du centre, d'autres fois reportée à une extrémité ; ou bien, il en existe plusieurs disposées à la file, en chapelet. Il est des espèces où on les observe couramment, chez le *Spirillum undula* par exemple, comme l'a montré Zettnow (1), chez les *Bacillus Zopfii*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus subtilis*.

L'action de la chaleur ou des réactifs chimiques peut contracter le protoplasme en deux ou plusieurs masses rondes séparées par des intervalles hyalins ou très peu colorés. Ces masses rondes font l'effet de diplocoques ou de coccus en chapelet et ont été souvent prises pour tels ; on en a de même fait des spores.

La question du *noyau* est une des plus controversées. Ici plusieurs opinions sont en présence. Pour certains, le noyau n'existe pas chez les Bactéries ; pour d'autres, le noyau ne s'y trouve pas à l'état nettement individualisé et différencié, mais la substance nucléaire est plus ou moins fractionnée, disséminée dans le cytoplasme ; d'autres, enfin, croient à l'existence d'un noyau typique.

(1) Zettnow, Ueber den Bau der grossen Spirillen (*Zeitschr. für Hygiene*, XXIV, 1897, p. 72).

L'existence d'un véritable noyau ou de granulations de substance nucléaire chez tous les êtres inférieurs voisins doit conduire à rejeter l'absence d'un tel organe. Par contre, les faits observés en très grand nombre conduisent plutôt à admettre la seconde opinion, la fragmentation plus ou moins grande, parfois très grande, du noyau, la sub-



Fig. 11. — *Bacille du charbon.* Formation de vacuoles et granulations protoplasmiques (d'après Fischer).





Fig. 12.
A, *Bacille typhique* : B, *Spirille du choléra.* Vacuoles et granulations protoplasmiques (d'après Fischer).

stance nucléaire, la chromatine, pouvant être mélangée au cytoplasme sous forme de granules très fins, ou différenciée en un nombre plus ou moins grand de chromidies, granulations de dimensions variables; c'est un noyau diffus ou fractionné, constituant plutôt ce qu'on a appelé un système chromidial. D'après Swellengrebel (1), ce système chromidial, chez le *Bacillus maximus buccalis* que l'on trouve dans le tartre dentaire, et chez le *Spirillum giganteum* et le *Spirillum volutans*, formerait un filament longeant l'axe de la cellule en décrivant une spirale (fig. 13 et 14).

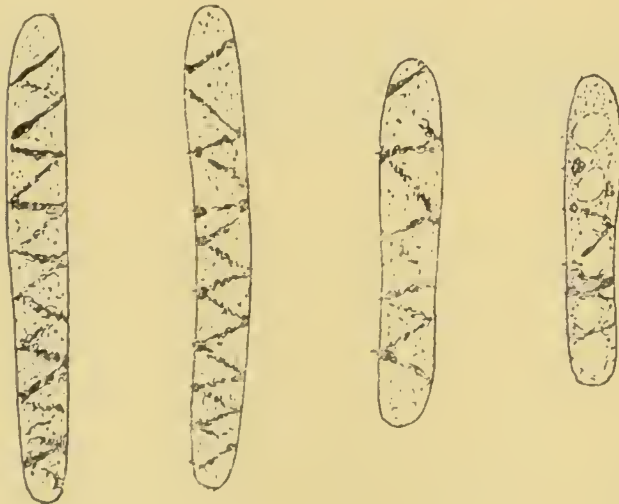


Fig. 13. — *Bacillus maximus buccalis* (d'après Swellengrebel). Grossissement comme figure 14.

Beaucoup des granulations du cytoplasme fixent en effet fortement les colorants nucléaires et, par là et d'autres caractères spéciaux de coloration, se distinguent nettement d'autres granulations dont il sera parlé ci-après, ce qui permet de les considérer comme étant de nature chromatique.

Pour Bütschli, le corps central serait tout entier un noyau : les Bactéries seraient des cellules constituées presque exclusivement par un noyau, le cytoplasme étant réduit à une mince couche située sous la membrane; ce cytoplasme pourrait même manquer et la cellule se

(1) Swellengrebel, Zur Kenntniss der Cytologie von *Bacillus maximus buccalis* Miller (*Centralbl. für Bakt.*, 2te Abth., XVI, 1906). — Cytologie comparée des Spirochètes et des Spirilles (*Ann. de l'Inst. Pasteur*, XXI, 1907, p. 448). — Neuere Untersuchungen über die Vergleichende Cytologie der Spirillen und Spirochäten (*Centralbl. für Bakt.*, Originale, XLIX, 1909, p. 529).

trouver alors entièrement constituée d'un noyau. C'est la grande affinité du contenu cellulaire pour les colorants qui a conduit Bütschli à cette conception, affinité qui, à vrai dire, n'est pas exclusivement propre à la substance chromatique, mais se remarque souvent dans le protoplasme chez bien des êtres inférieurs, en particulier des Flagellés, des Saccharomycètes, même chez les Spermatozoïdes, dont le parenchyme chromophile contient un véritable noyau.

Pour Ruzicka (1) toute la substance, colorable contenue dans les bâtonnets du *Bacille du charbon* se comporterait, vis-à-vis des agents chimiques, comme la chromatine des noyaux cellulaires.

Beaucoup croient à l'existence chez les Bactéries d'un vrai noyau. Bien des observations à l'appui, toutefois, se rapportent à des types dont la place est certainement ailleurs, chez les Flagellés ou les Algues principalement; il est donc impossible de faire état de ces données pour les Bactéries.

Arthur Meyer (2) est un des partisans convaincus de l'existence du noyau chez ces êtres. Chez le *Bacillus asterosporus* et beaucoup d'autres espèces, après fixation au formol et coloration à la fuchsine, il observe de 1 à 6 granulations fortement colorées, qu'il admet être des noyaux; un noyau apparaîtrait toujours au moment de la formation de la spore et interviendrait directement dans ce processus. C'est aussi l'opinion d'Amato (3) qui signale en plus une granulation nucléaire dans les cellules très jeunes, granulation qui plus tard se dissocierait en système chromidial.



Fig. 14. — *Spirillum giganteum* (d'après Swellengrebel).

Zeiss, apochr., 2 millim., oc. comp. 18. Dans 3 et 4, on aperçoit des grains de volutine noirs avec centre clair.

En résumé, il peut sembler raisonnable d'admettre que, chez les Bactéries en général, la substance nucléaire est d'ordinaire ou diffuse ou fractionnée en un système chromidial; dans certaines circonstances, chez les éléments très jeunes et lors de la formation de spores, elle peut se condenser, en partie ou en totalité, pour former une granulation nucléaire bien reconnaissable; l'existence d'un noyau bien individualisé serait donc au moins exceptionnelle.

Le fait de l'existence d'un noyau fractionné est, du reste, signalé chez beaucoup de Champignons inférieurs. Cette division du noyau en

(1) Ruzicka, Sporenbildung und andere biologische Vorgänge bie dem *Bacillus anthracis* (*Arch. für Hygiene*, 1908, LXIV, p. 219).

(2) Arthur Meyer, Der Zellkern der Bakterien (*Flora oder allgem. botanische Zeitung*, 1908, p. 335).

(3) Amato, Ueber die feine Struktur der Bakterien (*Centralbl. für Bakt.*, Originale, XLVIII, 1908, p. 385).

plusieurs masses peut même dépendre des conditions de vie; Bonin (1) a montré que chez les Levures le noyau, normalement unique, se segmentait sous l'influence d'une concentration exagérée du milieu nutritif, d'un manque d'aliments minéraux ou d'une élévation de température.

A côté des granulations nucléaires se trouvent souvent d'autres *granulations*. Certaines ont la propriété de prendre, sous l'influence de divers réactifs colorants, particulièrement les couleurs d'aniline bleues, violettes et vertes, une coloration rougeâtre bien nette ; en abaissant l'objectif, elles apparaissent d'un rouge rubis brillant et prennent une teinte bleutée quand on l'élève ; avec une mise au point très exacte, elles semblent formées d'une substance vitreuse incolore. Parfois le même aspect s'observe sans faire intervenir de réactifs. On a d'abord donné le nom de *grains rouges* à ces inclusions. Ernst (2), qui les a signalés le premier, en faisait des noyaux, puis des grains sporogènes, pensant qu'il jouaient un rôle important dans la formation des spores. Ils sont situés de préférence aux extrémités des éléments ou autour des vacuoles. Les *corpuscules métachromatiques*, signalés par Babès (3) chez plusieurs espèces, le *Bacille de la diphtérie* surtout, sont de même nature.

D'après Künstler et Busquet (4), la coloration ainsi observée serait due à un phénomène physique et non à une affinité spéciale pour les réactifs colorants. Beaucoup de Bactéries ne montrent jamais de ces grains rouges et, d'un autre côté, on en trouve chez beaucoup d'Algues, chez des Saccharomycètes, des Mucorinées, des Flagellés, des Sporozoaires et des Infusoires ciliés, se montrant toujours en indépendance très nette du noyau (5).

Les observations de Grimme (6) montrent bien nettement que ces corpuscules métachromatiques restent tout à fait indépendants du processus de formation des spores ; il tend à les considérer comme des produits de réserve.

C'est aussi l'opinion d'Arthur Meyer (7) qui les a étudiés surtout chez le *Spirillum volutans*, où ils sont très abondants ; il les nomme pour cette raison *grains de volutine*. Il admet aussi leur indépendance absolue du noyau et les considère comme formés d'une sorte de matière albuminoïde, contenant une forte proportion d'acide nucléique, la *volutine*, s'amassant dans les cellules tout comme la graisse, le glycogène, principalement avant la sporulation, pour être utilisée pendant ce processus.

(1) M. Bouin, Contribution à l'étude du noyau des Levures (*Arch. d'anat. micr.*, I, 1898).

(2) Ernst, Ueber Kern-und Sporenbildung bei den Bakterien (*Zeitschr. für Hygiene*, V, 1888). — Ueber den Bau der Bakterien (*Centralbl. für Bakt.*, 2[te] Abth., VIII, 1902, p. 1, 34, 57).

(3) Babès, Ueber isoliert farbbare Antheile in Bakterien (*Zeitschr. für Hygiene*, V, 1888). — Beobachtungen über die metachromatischen Körperchen, Sporenbildung, Verzweigung, Kolben und Kapselbildung pathogener Bakterien (*Ibid.*, XX, 1895, p. 412).

(4) Künstler et Busquet, Recherches sur les grains rouges (*C. R. de l'Acad. des sc.*, 6 décembre 1897).

(5) Guilliermond, Les corpuscules métachromatiques ou grains de volutine (*Bull. de l'Inst. Pasteur*, IV, 1906, p. 145).

(6) Grimme, Die wichtigshen Bachladen der Bakterienfärbung (*Centralbl. für Bakt.*, 1 Abth., Originale, XXXII, 1902, p. 1).

(7) Arthur Meyer, Orientierende Untersuchungen über Verbreitung Morphologie und Chemie des Volutins (*Bot. Zeitung*, LXII, 1904, p. 113).

Les réactions caractéristiques de cette volutine sont la coloration au bleu de méthyle ou à la fuchsine phéniquée additionnée de 1 p. 100 d'acide sulfurique, sa solubilité dans l'eau bouillante, l'eau de Javel, le chloral hydraté; après durcissement par le formol, elle devient insoluble dans ces liquides.

Pour Hugo Marx (1), la présence et le développement de ces grains seraient en rapport direct avec les propriétés biologiques des espèces, la virulence en particulier pour les espèces pathogènes. On a même avancé qu'il était possible de différencier un *Bacille diphtérique* virulent de *Bacilles pseudo-diphtériques* grâce à leur présence chez le premier et leur absence chez les autres. Behring (2), de son côté, a affirmé que la partie toxique de la tuberculine de Koch ne serait autre que la volutine de Meyer. Toutes ces assertions demandent encore confirmation. Si elles étaient vraies, les corpuscules métachromatiques auraient une importance considérable, représentant des éléments dont dérivent les toxines et les ferments, qui ont une place si grande dans la biologie microbienne.

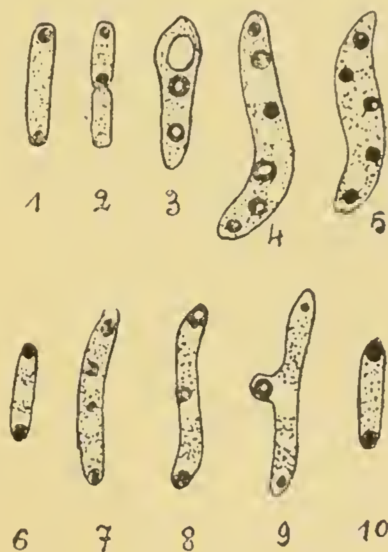


Fig. 15. — Corpuscules métachromatiques ou grains de volutine (d'après Grimme).

1, 2, *Bacillus alvei*; 3, bâtonnet à spores du même; 4, 5, *Spirillum volutans*; 6, 7, 8, 9, 10, *Bacille de la diphtérie*.

Dans certains cas, le protoplasma, trouble, grisâtre, contient des granulations graisseuses. L'analyse chimique des Bactéries indique, en effet, souvent la présence de graisse.

Chez les *Beggiatoa* qui vivent dans les eaux thermales sulfureuses et dans toutes les eaux qui contiennent de l'hydrogène sulfuré, et qui sont parfois encore rangées parmi les Bactéries, on trouve, dans l'intérieur de la cellule, de fins granules qui souvent y sont en très grande abondance. Leur biréfringence dans la lumière polarisée paraît démontrer nettement leur nature cristalline. Parmi les autres caractères, leur solubilité dans l'alcool absolu et le sulfure de carbone indique qu'ils sont formés de soufre. Les filaments jeunes et minces n'en possèdent pas encore; ce soufre est une véritable réserve accumulée à certains moments dans le protoplasma.

Certaines granulations protoplasmiques se colorent en rouge brun par le chloro-iodure de zinc; elles semblent par là être formées de glycogène.

La masse du protoplasma est formée de matières albuminoïdes; en faisant agir l'iode, on observe une coloration jaune très nette.

L'iode teint en bleu le protoplasma de plusieurs espèces (*Bacillus butyricus*, *Bacillus Pasteurianus*, *Spirillum amyliferum*, *Sarcina ventriculi*). Cette coloration est due à la présence d'amidon soluble, dissous dans le protoplasma. Le phénomène ne s'observe parfois qu'au moment

(1) H. Marx et Waithe, Morphologische Untersuchungen zür Biologie der Bacterien (*Centralbl. für Bakt.*, XXVIII, 1900, p. 1, 33, 65, 97). — Ein Verfahren zur Virulenz bestimmung der Bacterien (*Arch. für klin. Chirurgie*, Bd. LXII, 1900, p. 580).

(2) Behring, *Congrès international de la tuberculose*, Paris, 1905.

de la formation des spores. Dans les bâtonnets de *Bacillus butyricus*, la matière amylacée, dont on suit pas à pas le développement avec l'eau iodée, se montre d'abord aux deux extrémités, puis au milieu, et enfin dans tout le protoplasma ; quand la spore se forme, l'amidon disparaît de l'endroit où elle va se former. Cet amidon est, sans aucun doute, une matière de réserve destinée à subvenir aux besoins nutritifs spéciaux qui se font sentir au moment de la formation de la spore.

Presque toutes les Bactéries, vues isolées, paraissent incolores. En amas, cependant, elles présentent d'habitude une teinte bien nette ; certaines, dénommées pour cette cause *Bactéries chromogènes*, sont vivement colorées ; les autres n'ont qu'une nuance blanchâtre ou jaunâtre. Même dans le premier cas, une cellule isolée paraît incolore, à cause de sa petitesse. Parfois la coloration paraît due au protoplasma : on peut quelquefois s'en rendre compte dans les espèces de grande taille, surtout chez les Beggiatoacées colorées, où le microscope fait aisément voir des granulations colorées. Chez d'autres, la matière colorante semble imprégner seulement la membrane et surtout la couche gélatineuse externe. Ces pigments peuvent sortir des cellules et se répandre dans le milieu ambiant, qu'ils colorent d'une manière plus ou moins uniforme. Cette diffusion semble se produire dans des conditions normales pour certaines espèces ; ou bien, pour d'autres, ne se montrer que dans des conditions anormales de nutrition ou après la mort des cellules ; elle peut dépendre aussi des conditions de solubilité du pigment.

Les nuances de ces pigments sont très variées. Le rouge plus ou moins rosé s'observe fréquemment ; les *Micrococcus prodigiosus*, *Micrococcus roseus*, *Spirillum rubrum*, *Bacillus rosaceus metalloides* montrent différentes teintes de cette couleur. Les *Sarcina lutea*, *Micrococcus pyogenes aureus*, *Bacillus luteus*, *Micrococcus aurantiacus* donnent du jaune pur ou du jaune orangé. Le bleu s'observe plus rarement ; le *Bacillus indigonaceus*, le *Bacillus indigoferus* produisent un pigment bleu foncé ; le Bacille du lait bleu, *Bacillus syncyanus*, peut teindre parfois rapidement en bleu de ciel des masses assez considérables de lait ; le *Bacillus pyocyaneus* colore le pus en gris verdâtre et sécrète une matière colorante d'un beau bleu. Le *Bacillus violaceus* forme à la surface des milieux solides une épaisse membrane colorée en violet noir. Un pigment vert a été décrit par Van Tieghem (1) chez deux espèces, qu'il a nommées pour ce fait *Bacterium viride* et *Bacillus virens* ; Engelmann (2) a étudié aussi une Bactérie verte, qu'il désigne sous le nom de *Bacterium chlorinum*. Ces auteurs pensent, sans apporter de preuves à l'appui de leur opinion, que la matière colorante est identique à la chlorophylle, ce dont il est permis de douter. Le *Bacillus chlororaphis* (3) produit dans certains milieux des houppettes cristallines d'un très beau vert. D'autres espèces paraissent pouvoir produire plusieurs pigments ou, tout au moins, donnent des nuances plus ou moins différentes, selon leurs conditions de vie.

(1) Van Tieghem, Observations sur les Bactériacées vertes (*Bull. de la Soc. Bot. de France*, 1880, p. 174).

(2) Engelmann, Zur Biologie der Schizomyceten (*Bot. Zeit.*, 1882).

(3) Guignard et Sauvageau, Sur un nouveau microbe chromogène, le *Bacillus chlororaphis* (*Soc. de Biol.*, 22 décembre 1894).

Le mode de formation de ces pigments est peu connu. Les espèces ne semblent les produire que dans certaines conditions, et pas dans d'autres, tout en se développant aussi bien. Le *Bacillus syncyanus* ne développe aucune matière colorante dans les solutions sucrées; le *Bacillus violaceus* donne souvent dans la gélatine, qu'il liquéfie, une culture blanche, ne montrant qu'une très faible nuance violette aux bords où la masse subit un commencement de dessiccation. Nous verrons, du reste, que cette propriété de produire du pigment est une fonction tout à fait contingente, que l'espèce peut perdre dans des conditions données sans grand inconvénient. Il était toutefois bon de la signaler ici, lors de l'étude morphologique du protoplasma.

La nature et la composition chimique de ces pigments ne sont pas établies. Ils ne s'isolent la plupart du temps que très difficilement et en quantité trop minime. Certains d'entre eux semblent se rapprocher des couleurs d'aniline par les propriétés optiques de leurs solutions; d'autres de matières colorantes connues sous le nom de *lipochromes*.

La matière colorante des *Beggiatoacées roses* a été isolée et étudiée par Ray Lankester (1) qui a donné à ce pigment, tantôt rose rouge, tantôt couleur fleur de pêcher ou violet intense, le nom de *bactério-purpurine*. Elle est insoluble dans l'eau, l'alcool, le chloroforme, l'ammoniaque, les acides acétique et sulfurique. L'alcool bouillant fait virer sa teinte au brun. Elle montre, au spectroscope, des bandes d'absorption toutes spéciales : une large bande dans le jaune près de la raie D de Fraunhofer; deux faibles dans le vert, près des raies E et *b*; une faible dans le bleu, près de la raie F; puis, à partir de la raie G, un assombrissement de la partie la plus réfrangible du spectre. En se basant sur l'analyse spectrale, on devrait plutôt rapprocher la bactério-purpurine de l'alizarine ou de la purpurine que des rouges d'aniline, comme on l'a fait tout d'abord. La teinte varie beaucoup, suivant l'âge et l'activité de la cellule; elle passe du rose clair au pourpre violet. Elle tourne au brun après la mort de l'élément. Certains pigments des Bactéries semblent voisins de cette substance ou même identiques à elle.

La matière colorante formée par le *Bacillus pyocyaneus* a été plus complètement étudiée. C'est l'espèce qui occasionne le phénomène du *pus bleu*, bien connu des chirurgiens. Fordos (2) a, le premier, isolé le pigment bleu, la *pyocyanine*, à l'état pur, en traitant par l'eau ammoniacale les linges de pansement bleuis par la sécrétion. Le liquide, agité avec du chloroforme, lui cède la pyocyanine que l'on obtient cristallisée par évaporation du dissolvant. Après purification, les cristaux affectent des formes variables. Le plus souvent, ce sont des lamelles rectangulaires ou de longues aiguilles isolées ou réunies en faisceaux, en aigrettes ou en étoiles; parfois ce sont des octaèdres ou des tables rhombiques ou hexagonales. Les cristaux présentent une teinte bleue. Les amas de cristaux sont d'un bleu foncé terne, rappelant l'indigo. Cette pyocyanine a été étudiée depuis très complètement par Gessard (3) qui en a précisé les caractères. D'après lui, c'est une base que les réactions

(1) Lankester, On a peach coloured Bacterium (*Quarterly Journal of Micr. science*, vol. XIII, 1873). — Id., Further Observations on a peach or red coloured Bacterium (*Ibid.*, vol. XVI, 1876).

(2) Fordos, Recherches sur la matière colorante des suppurations bleues : pyocyanine (*C. R. de l'Acad. des sc.*, 1860, t. LI, p. 215).

(3) Gessard, De la pyocyanine et de son microbe. Thèse de Paris, 1882.

rapprochent des ptomaïnes. L'air, les substances réductrices la transforment en une matière colorante jaune, déjà signalée par Fordos, la *pyoxanthose*. Les rapports du pigment avec la Bactérie ont été établis sur des bases certaines au moyen de cultures pures de l'espèce isolée du pus bleu. D'autres de ces pigments seraient à regarder comme des matières grasses (1). De plus amples détails seront donnés plus loin, au chapitre consacré à l'étude biologique des Bactéries chromogènes.

3. FORMATION DES ZOOGLÉES

La couche externe gélifiée de la membrane de bien des espèces peut être très développée, se gonfler énormément, en absorbant de l'eau, de façon à occuper plusieurs fois son volume primitif. Il se forme ainsi une sorte de gelée entourant les éléments, qui sont réunis en un point, constituant des amas plus ou moins considérables que l'on appelle des *colonies*. Cette formation de gelée est plus ou moins forte suivant l'espèce et les conditions vitales. Dans une même colonie, ces gaines de matière visqueuse des individus voisins se touchent et peuvent se fusionner, de manière à constituer une masse fondamentale homogène dans laquelle sont enfouis les éléments, ou qui, peu abondante, les retient seulement accolés les uns à côté des autres, formant de la sorte des amas muqueux d'aspect et de dimensions variables, suivant l'espèce qui les constitue. Ces amas sont des *Zooglées*.

Le mode d'union dépend, pour beaucoup, du degré de diffluence du substratum. Certaines espèces, cultivées dans des milieux liquides, se répandent dans toute la masse, à cause du peu de consistance de la partie gélifiée; on peut alors arriver à leur faire former des Zooglées compactes et de forme déterminée, en les cultivant sur des milieux solides. On rencontre, du reste, tous les intermédiaires entre les espèces dont les éléments semblent parfaitement isolés les uns des autres et celles où les cellules forment, par leur réunion, des masses mucilagineuses solides et bien déterminées.

On observe fréquemment, dans les fabriques de sucre, des masses gélatineuses hyalines, mamelonnées, de consistance élastique, qui se développent rapidement dans les cuves où l'on recueille les jus de betterave ou les sirops cuits. La forme et l'apparence leur ont fait donner, en France, le nom vulgaire de *Gomme de sucreries*, et, en Allemagne, celui de *Frai de grenouille* (*Froschlaich*) (2). Ce sont les Zooglées d'une espèce de Bactéries à cellules sphériques, le *Leuconostoc mesenteroides* (fig. 16; *10*). Les cellules forment des chapelets enfermés dans une épaisse gaine de gelée de consistance assez ferme, presque cartilagineuse. Les cylindres ainsi constitués se serrent les uns contre les autres en s'enveloppant dans leurs sinuosités et arrivent à former des masses irrégulières pouvant atteindre des dimensions beaucoup plus grandes que celles données par la figure. C'est un type bien net de Zooglée.

(1) Overbeck, Zur Kenntniss der Fettfarbstoffproduktion bei Spaltpilzen (*Nova Acta d. Kais. Leop. Car. Deutsch. Acad. d. Naturf.*, IV, 1891).

(2) Van Tieghem, Sur la gomme de sucreries (*Ann. des sc. nat., Bot.*, 6e série, t. VII, p. 180). — Cienkowski, Die Gallertbildungen des Zuckerrübensaftes. Charkow, 1887. — Zettnow, Ueber Froschlaichbildungen in Saccharose enthaltenden Flüssigkerten (*Zeitschr. für Hygiene*, 1907, LVII, p. 154).

Les habitants du haut Caucase préparent une boisson acidule, très usitée comme aliment et comme médicament sous le nom de *kéfir*, en soumettant le lait à l'action d'un ferment spécial, connu dans ces pays sous le nom de *Grains de kéfir*. Ces *Grains* sont formés, en majeure partie, par les Zooglées d'une Bactérie, nommée *Bacillus caucasicus* par certains observateurs. Ce sont de petites masses d'un gris jaunâtre, dont

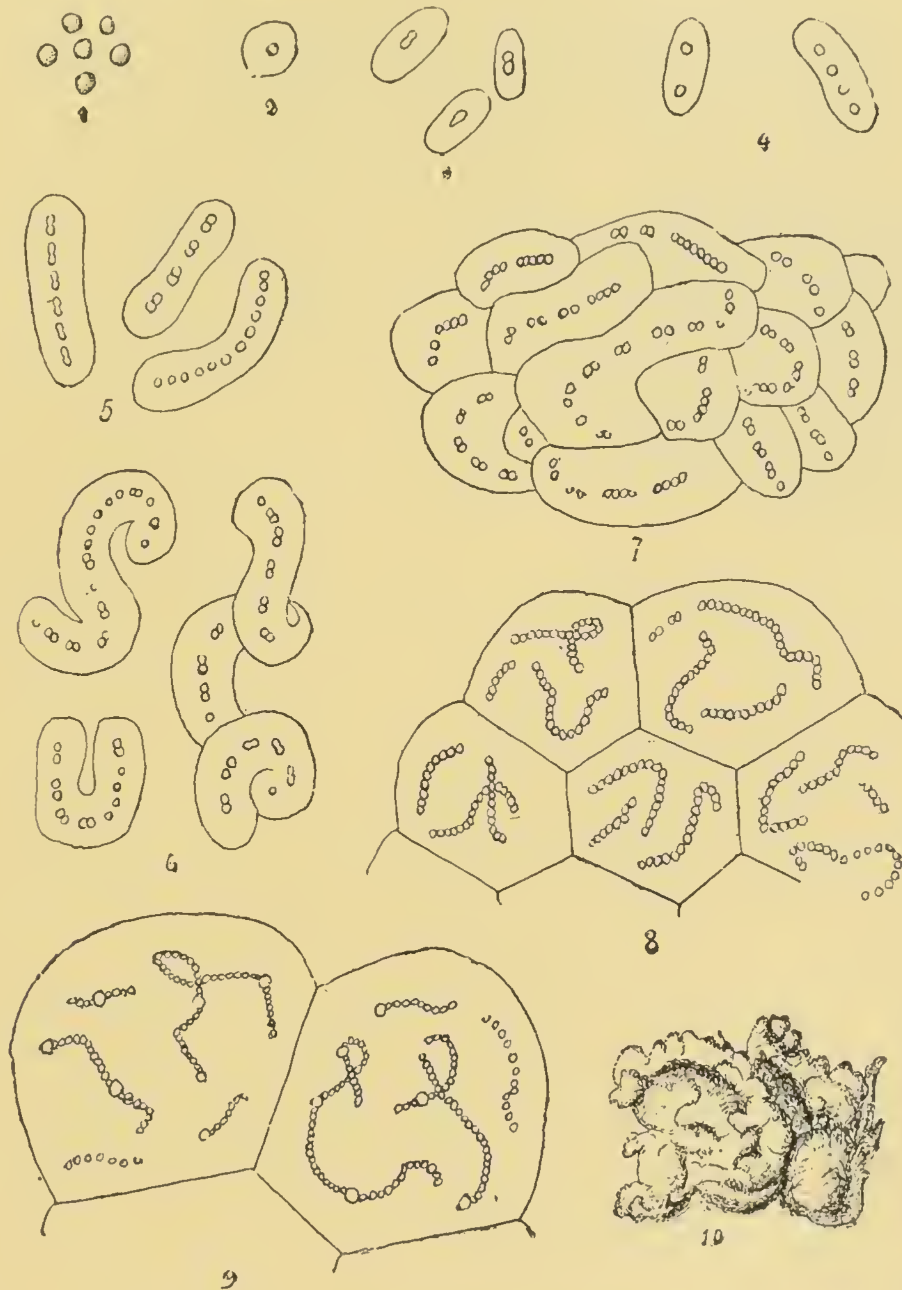


Fig. 16. — *Leuconostoc mesenteroides*.

10, aspect d'une Zooglée (grandeur naturelle) ; *1-9*, détails de la Zooglée (d'après Van Tieghem).

l'aspect et la consistance rappellent assez bien des petites boulettes de mie de pain pétrie et séchée. La grosseur varie de celle d'une petite tête d'épingle à celle d'une noisette ; la surface en est tantôt lisse, tantôt mamelonnée. Elles se laissent assez facilement couper au rasoir, lorsqu'elles ne sont pas trop durcies ; leur consistance est alors celle du cartilage desséché. La matière muqueuse produite par la Bactérie englobe dans sa masse de nombreuses cellules d'une Levure qui joue un rôle important dans la fabrication de la boisson. De plus amples détails

seront donnés lors de l'étude spéciale du *Bacillus caucasicus*.

Beaucoup de Bactéries chromogènes forment sur les matières nutritives solides des Zooglées à teintes très vives. Souvent, sur le blanc d'œuf cuit ou les matières amylacées cuites exposés à l'air, il apparaît, après quelques jours, de petites taches lenticulaires, d'abord rosées, puis devenant d'un rouge-sang en grandissant. Ces petits disques à bords nets, d'aspect huileux, sont les Zooglées du *Micrococcus prodigiosus*.

La forme de la Zooglée peut du reste varier, et dans des limites assez larges pour une espèce, suivant le milieu où elle se développe et surtout suivant que ce milieu est un solide ou un liquide. Le développement de certaines espèces dans les liquides est parfois curieux à connaître et peut apporter de précieux éléments de détermination.

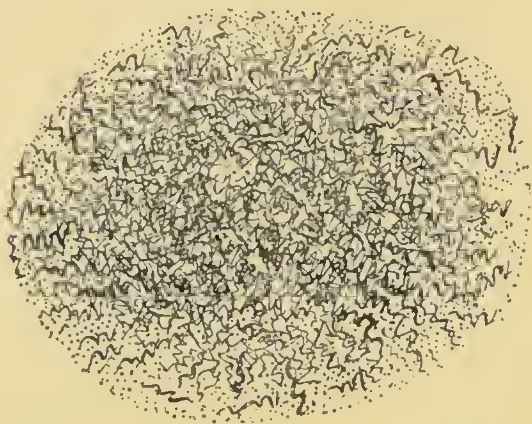


Fig. 17. — Zooglée de Spirilles, 500/1 (d'après Cohn).

Beaucoup de Bactéries en spirale ou en longs filaments forment dans les liquides des flocons, plus ou moins résistants, constitués par l'enchevêtrement des éléments les uns dans les autres. Les cellules sont parfois réunies en plus par de la matière muqueuse, qui donne plus de consistance à la Zooglée (fig. 17).

Le *Bacillus aceti* et le *Bacillus subtilis* se développent à la surface des liquides de culture en y constituant une membrane à laquelle on donne, d'une façon générale, le nom de *voile* ou de *mycoderme*. Le premier forme une peau blanche, épaisse, à surface lisse, de consistance dure, même presque cartilagineuse, que tout le monde connaît sous le nom de *Mère de vinaigre*. Le second donne, sur les bouillons, une pellicule grisâtre, épaisse, ridée, se divisant en lambeaux par l'agitation.

Le *Bacillus anthracis*, la Bactérie du *charbon* de l'homme et des animaux, se développe en un voile très incomplet et limité à la périphérie de la surface liquide ; ce voile se détache par petites portions, qui tombent en flocons blanchâtres dans la masse du liquide. Ces flocons nagent quelque temps dans le milieu, sans en troubler la transparence, puis se déposent au fond en un sédiment blanc.

D'autres espèces, *Bacillus butyricus* et *Bacterium termo*, par exemple, semblent ne pas former de pellicule à la surface ou n'en donner qu'une très mince, et envahissent toute la masse liquide, qu'ils troublent d'une façon alors uniforme.

Une Bactérie que l'on observe dans des solutions salines, l'*Ascococcus Billrothii*, présente un mode tout spécial de formation de Zooglée. La matière mucilagineuse n'englobe pas chaque élément en l'isolant des autres sur une partie de sa longueur ; les cellules, au contraire, se rapprochent et s'accolent pour former de petites masses rondes ou ovoïdes. Le gelée excrétée vient entourer chacune des nombreuses colonies d'une épaisse coque transparente (fig. 18). Il peut en être de même des espèces décrites sous le nom générique d'*Ascobacterium*.

C'est, en somme, sur ce dernier type que se forment les couples ou les tétrades de diverses Bactéries dites *capsulées*, telles que le *Pneumo-*

coque, le *Micrococcus tetragenus* ; ces couples ou ces tétrades peuvent représenter de petites Zooglées à coque seulement extérieure, comme celle de l'*Ascococcus*.

On voit, par les détails qui précèdent, quelles nombreuses variétés on

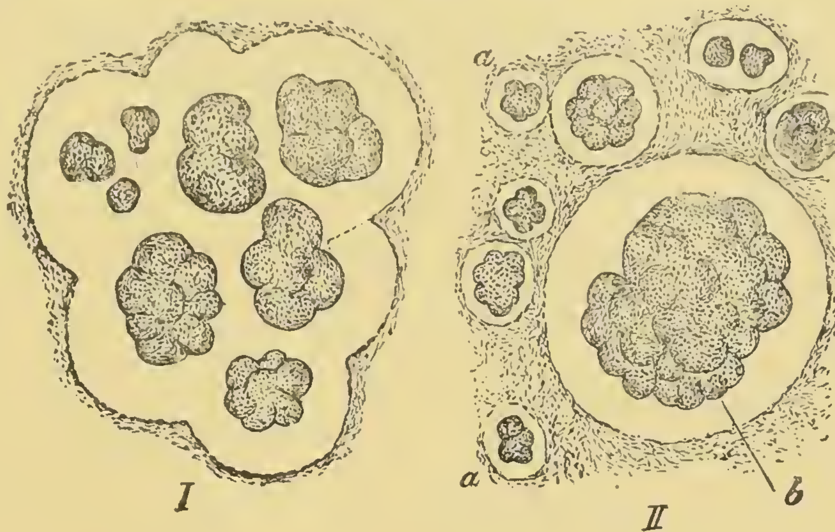


Fig. 18. — *Ascococcus Billrothii*, 65/1 (d'après Cohn).

rencontre dans le mode de groupement des différentes espèces en Zooglées, et quels importants caractères on en peut tirer pour arriver à leur détermination.

4. MOTILITÉ

Nous savons déjà que beaucoup de Bactéries possèdent la propriété de se mouvoir librement dans les liquides et de se transporter ainsi, plus ou moins vite, parfois lentement, parfois très vite, d'un point à un autre. C'est un des caractères qui avaient le plus frappé les anciens observateurs. Certaines traversent comme des flèches le champ du microscope ; il peut même être difficile, dans ce cas, de les examiner à loisir. D'autres sont animées d'un mouvement de déplacement lent. Le mouvement peut alors, le plus souvent, être décomposé en deux : un mouvement d'oscillation autour d'un axe idéal perpendiculaire à l'axe longitudinal et un mouvement de translation suivant cet axe longitudinal. Pour beaucoup, le premier de ces mouvements est remplacé par un mouvement de véritable oscillation pendulaire, la Bactérie semblant fixée par une extrémité, tandis que l'autre décrit une portion de circonférence. Dans d'autres cas, les filaments s'avancent en tournant autour de leur axe longitudinal. Cette sorte de mouvement s'observe surtout chez les formes spiralées ; la spirale tourne, comme un tire-bouchon, autour de l'axe de l'hélice qu'elle décrit. A ce mouvement, qui est parfois très vif, s'en joint, dans certaines espèces en spirale, un autre d'ondulations semblables à celles du corps d'un serpent ; Ehrenberg avait distingué ces formes des autres formes spiralées et avait établi pour elles son genre *Spirochæte*. Dans la préparation de Bactéries mobiles, à côté des individus qui se meuvent, il y en a d'autres absolument immobiles : ceux-ci adhèrent à la lamelle ou entre eux, ou sont des cellules mortes.

Les formes sphériques, les *Micrococcus*, présentent souvent un mouvement net et régulier, ressemblant à une sorte de trépidation, que l'on

peut confondre avec les phénomènes du *mouvement brownien*. On sait que l'on désigne par ce terme une agitation observée fréquemment lorsqu'on examine au microscope, à de forts grossissements, des granulations de différentes sortes et de diamètre très réduit, de un à quelques millièmes de millimètre, en suspension dans un liquide. Les causes en sont peu connues. Les agents physiques, la chaleur et l'électricité surtout, les courants osmotiques contribuent certainement, mais pour une part variable et non encore déterminée, à la production de ce phénomène. Sa caractéristique est d'être influencé, dans de très larges limites, par ces mêmes causes auxquelles on l'attribue. La chaleur, par exemple, l'accélère toujours. Il paraît, au contraire, résister complètement à l'action des agents chimiques qui ont le pouvoir reconnu de diminuer ou d'arrêter les mouvements d'origine vitale. C'est ainsi que des substances coagulantes très énergiques, l'acide osmique, l'alcool absolu, les acides minéraux concentrés, détruisent rapidement toute contractilité dans les cellules avec lesquelles elles sont mises en contact direct; elles peuvent, au contraire, n'avoir aucune action sur des granulations inorganiques ; l'augmentation des courants de diffusion dans les liquides avec lesquels elles se mêlent pourrait même augmenter cette trépidation brownienne. Il est à noter que, pour observer l'action des réactifs chimiques, il faut laisser s'écouler un temps variable suivant la facilité avec laquelle le liquide actif peut arriver par diffusion jusqu'à la portion contractile, le protoplasma, des éléments sur lesquels on le fait agir.

Le mouvement brownien s'observe peut-être moins souvent qu'on n'est porté à le croire dans les préparations microscopiques de Bactéries dans des liquides. Lorsqu'on a affaire à des espèces manifestement immobiles de l'accord de tous, soit Micrococcus, comme *Micrococcus ureæ*, soit Bacilles, comme *Bacillus anthracis*, on a beau faire usage de liquides de différente densité et de différente composition, l'immobilité est toujours bien évidente : il faut, naturellement, mettre de côté les mouvements purement accidentels, dus aux courants du liquide ou à son évaporation. De nombreuses espèces présentent, au contraire, dans les mêmes conditions, un mouvement lent et obscur, mouvement de trépidation manifeste, ne semblant pas servir au déplacement des éléments, puisque chacun d'eux revient, après une sorte d'oscillation, à la place qu'il occupait avant. Ces derniers mouvements, isochrones, réguliers, s'observant quelle que soit la nature du liquide où les cellules sont en suspension, doivent être évidemment distingués du mouvement brownien, purement physique, et considérés comme une manifestation, bien obscure il est vrai, de la vitalité des éléments qui le présentent.

Ce sont, parmi les caractères de cette classe d'êtres, les mouvements qui avaient surtout frappé les premiers observateurs. Ils y voyaient une preuve irréfutable de la nature animale des Bactéries. Lorsque Davaine (1), en étudiant la *Bactérie du charbon*, remarqua qu'elle restait immobile dans tous les stades où il l'observait, il se crut obligé de créer, pour cette espèce, un nouveau genre, le genre *Bacteridium*, différant des genres *Bacterium* et *Bacillus* par l'absence complète de motilité.

Le genre *Bacteridium* et l'opinion de son savant auteur ont dû céder

(1) Davaine, Recherches sur les Infusoires dans la maladie connue sous le nom de *sang de rate* (*C. R. de l'Acad. des sc.*, 1863, t. LVII, p. 320). Réimprimé dans « l'Œuvre de Davaine ». Paris, 1889, 1 vol. in-8.

devant l'observation d'un grand nombre d'espèces tout aussi immobiles et d'autres qui, mises dans des conditions de vie spéciales ou arrivées à certains stades de leur développement, présentent, à côté d'une période d'immobilité absolue, des phases de motilité bien évidente. Beaucoup d'espèces mobiles deviennent inertes lorsqu'elles vont produire des spores. Chez d'autres, très nombreuses, les cellules qui, isolées, présentent un mouvement très vif, restent complètement immobiles lorsqu'elles sont réunies en Zooglées compactes. C'est ce qui s'observe facilement dans les cultures de *Bacillus subtilis* dans les milieux liquides : les bâtonnets, épars dans le bouillon, sont très mobiles ; ceux qui forment le voile caractéristique à la surface sont, au contraire, tout à fait immobiles. Aussi, lorsqu'on veut examiner une parcelle de colonie à ce point de vue, est-il plus sûr de la délayer dans une petite quantité de bouillon et d'attendre quelque temps avant de se prononcer.

Le degré de motilité peut dépendre de la fluidité du liquide. Dans l'eau, elle est à son maximum ; quand le liquide devient plus dense, elle diminue de plus en plus pour cesser tout à fait lorsque le substratum devient solide. Elle reprend par addition d'eau. Les mouvements se montrent encore, mais réduits, dans des milieux très visqueux comme la gélatine au voisinage de son point de solidification ; ils existent même, quoique amoindris, dans la gélatine solidifiée, ce qui peut donner la raison de bien des détails de cultures dans ce milieu.

Les mouvements s'effectuent souvent indifféremment dans un sens et dans l'opposé ; il ne semble pas y avoir d'extrémité antérieure et d'extrémité postérieure dans le mouvement.

Certains agents physiques ont une grande influence sur la motilité. L'oxygène est souvent nécessaire ; si l'on fait une préparation microscopique de certaines espèces très mobiles, dans un liquide neutre, on peut se rendre compte qu'après quelque temps les Bactéries du centre sont toutes immobiles ; celles des bords, au contraire, trouvant facilement de l'oxygène, restent actives ; en lutant la préparation, on peut faire disparaître tout mouvement. La chaleur semble activer la motilité dans de certaines limites ; à un degré plus élevé, elle l'abolit ; la mort survient un peu plus haut. La lumière a, parfois, une action bien évidente ; le *Bacterium photometricum*, d'après Engelmann (1), n'est mobile que sous l'influence de radiations d'une certaine intensité ; il en serait de même du *Bacille violet*, d'après Marshall Ward (2). Les mouvements déterminés par ces conditions physiologiques passent la plupart du temps inaperçus ; les Bactéries avides d'oxygène se dirigent lentement vers l'endroit où ce gaz afflue ; d'autres, sensibles à la lumière, se rapprochent d'un rayon lumineux, mais si doucement que la progression échappe à l'observateur. Ces phénomènes de motilité, provoqués par les besoins vitaux, doivent, en toute probabilité, être distingués des mouvements vrais ; ils s'observent fréquemment chez des espèces manifestement immobiles dans les conditions normales d'existence. Matzuschita (3) a observé que les températures un peu élevées, 35° à 37°, dimi-

(1) Engelmann, Untersuchungen aus des phys. Laborat. zu Utrecht. Bacterium photometricum, 1882.

(2) Marshall Ward, A Violet Bacillus from the Thames (*Ann. of Bot.*, mars 1898).

(3) Matzuschita, Der Einfluss der Temperatur und Ernährung auf die Eigenbewegung der Bakterien (*Centralbl. für Bakt.*, 2te Abth., VII, 1901, p. 209).

nuent rapidement la motilité des Bactéries et finissent même par la faire disparaître. La nature du milieu de culture influe aussi beaucoup sur ce caractère ; les mouvements disparaissent assez vite sur les milieux solides, et particulièrement les pommes de terre, persistent au mieux dans les bouillons. Pour observer les mouvements dans les meilleures conditions, il faut se servir de cultures en bouillon développées à la température de la chambre.

Par analogie avec ce que l'on connaît en toute certitude chez beaucoup d'êtres inférieurs, Monades, Algues, Infusoires, on a été porté à attribuer la cause des mouvements des Bactéries à la présence de *cils vibratiles* très fins dont le tourbillonnement occasionnerait le déplacement de la masse de la cellule.

Ehrenberg (1), en 1833, a signalé, chez une espèce qu'il n'a pas suffisamment définie pour permettre de la reconnaître, son *Bacterium triloculare*, la présence d'une trompe filiforme, tourbillonnante, située à une extrémité de chaque bâtonnet. Cohn (2) figure plus nettement un long cil à chaque bout de la spire du *Spirillum volutans*. Koch est parvenu à voir et à photographier les cils vibratiles de plusieurs espèces après dessiccation et coloration avec une solution aqueuse d'extrait de bois de campêche. Il en donne d'excellentes reproductions dans un important mémoire publié en 1877 (3). Ils ont été aperçus depuis par d'autres observateurs sur les mêmes espèces ou sur des différentes. Dallinger et Drysdale (4) les ont décrits chez le *Bacterium termo*, où ils ont pu les étudier à l'aide de grossissements considérables. Des méthodes diverses de coloration rendent ces organes facilement visibles chez les espèces qui en possèdent. Les principales seront exposées plus loin avec détails (Voy. *Coloration des cils*).

D'après Reichert (5), on peut facilement apercevoir directement les cils chez beaucoup d'espèces mobiles en les examinant avec un fort éclairage dans des liquides un peu épais ou visqueux, ou mieux l'eau de condensation de la gélose ordinaire ou de la gélatine nutritive à 1 p. 100 maintenue liquide.

On est loin d'avoir découvert les cils vibratiles chez toutes les espèces mobiles. Leur absence chez les Bactéries de grande taille, où ils devraient être bien visibles s'ils existaient, doit faire penser qu'ils ne sont pas les organes exclusifs du mouvement. La contractilité du protoplasma joue certainement un grand rôle dans les phénomènes de motilité. Le protoplasma en se contractant entraîne la membrane, la cellule se déplace. Le même fait se trouve, du reste, chez des Algues manifestement dépourvues d'organes locomoteurs, les Oscillaires, les Diatomées, les Desmidiées, où les mouvements ne peuvent être attribués qu'à la contractilité protoplasmique. D'après Ellis (6), toutes les Coccacées

(1) Ehrenberg, Die Infusionsthierchen. Berlin, 1833.

(2) Cohn, Untersuchungen über Bacterien (*Beitr. zur Biol. der Pflanzen*, I, 2e p., p. 127).

(3) Koch, Untersuchungen über Bacterien (*Ibid.*, II, 3e p.).

(4) Dallinger et Drysdale, On the existence of flagella in Bacterium termo (*The Monthly Microscopical Journal*, 1875).

(5) Reichert, Ueber Lichtbarmachung der Geisseln und die Geisselbewegung der Bakterien (*Centralbl. für Bakt.*, Originale, LI, 1909, p. 14).

(6) Ellis, Der Nachweiss der Geisseln bei allen Coccaceen (*Centralbl. für Bakt.*, 2te Abth., IX, 1902, p. 546).

posséderaient un ou plusieurs cils. Beijerinck a décrit de longs cils chez la *Sarcina ureæ*.

La nature de ces cils a été contestée. Van Tieghem, se fondant surtout sur la difficulté de leur coloration par les réactifs qui teignent si rapidement le protoplasma, fait de ces prolongements de simples dépendances de la membrane, dépourvues de toute contractilité et, partant, de tout pouvoir locomoteur. Lorsque deux cellules, issues de la division d'un même élément, se séparent, la portion commune de la membrane, au lieu de se scinder nettement en deux, peut se laisser étirer en un filament qui se rompt plus ou moins près de chacune des deux cellules filles ; c'est ce prolongement qui constituerait le cil vibratile (1). Le fait de la résistance des cils aux matières colorantes ordinaires ne suffit pas pour faire nier leur origine protoplasmique ; on sait, en effet, que le protoplasma homogène, celui qui constitue la couche périphérique dépourvue de granulations de beaucoup de cellules, ne présente qu'une affinité

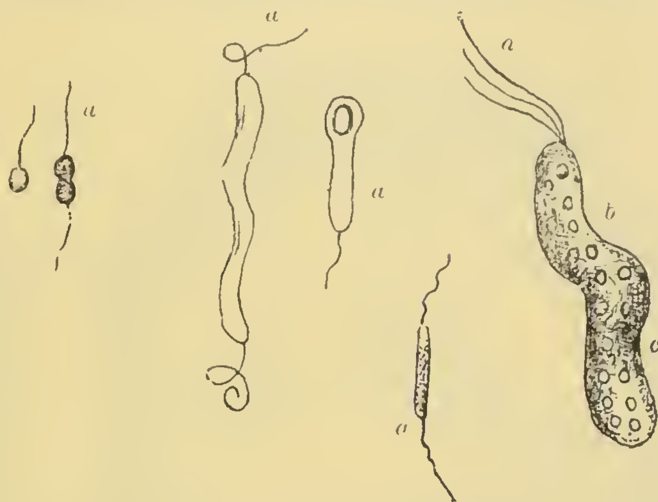


Fig. 19. — Cils vibratiles.


Fig. 20. — *Bacille typhique* avec cils vibratiles.


Fig. 21. — *Spirillum undula* avec cils vibratiles.

très faible pour les matières colorantes, qui teignent au contraire très fortement le protoplasma central. Bütschli a du reste signalé le même fait chez les Infusoires flagellates où les flagellums, très mobiles et en dépendance bien nette du protoplasma cependant, sont excessivement difficiles à colorer. Il serait, en outre, plus difficile d'expliquer la forma-

(1) Van Tieghem, Sur les prétendus cils des Bactéries (*Bull. de la Soc. Bot.*, 1879, p. 37).

tion de bouquets de cils, décrits chez des Bactéries spiralées. En dernier lieu, ces appendices n'ont, jusqu'alors, jamais été vus à des espèces immobiles. Il est plus rationnel de les considérer comme des cils vibratiles et de leur assigner véritablement une nature protoplasmique.

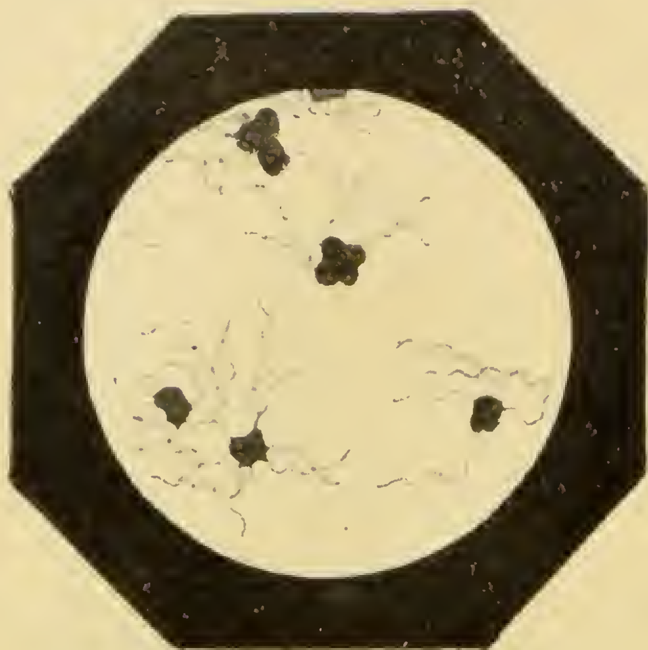


Fig. 22. — *Sarcina ureæ* avec cils vibratiles (d'après Zettnow).

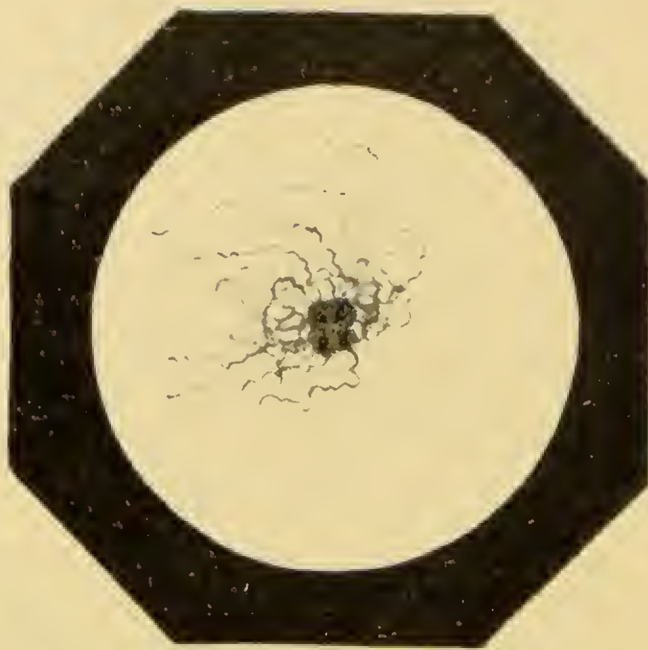


Fig. 23. — *Sarcina agilis* avec cils vibratiles (d'après Zettnow).

D'après les recherches récentes de ce dernier observateur, les cils seraient en dépendance exclusive de la membrane d'enveloppe. En comprimant fortement sous la lamelle des Bactéries de grande taille, l'espèce connue sous le nom de *Bacterium lineola* entre autres, la



Fig. 24. — *Spirilles du choléra* avec cils vibratiles.



Fig. 25. — *Proteus vulgaris* avec cils vibratiles.

membrane éclate à une des extrémités, le contenu s'écoule par l'orifice et laisse l'enveloppe tout à fait vide. En étudiant cette coque avec grande attention, Bütschli a remarqué qu'elle conservait toujours, à une extrémité, le long cil particulier à l'espèce, preuve qu'il n'émane

pas directement de la masse centrale molle du protoplasma. Des recherches postérieures de Fischer (1) battent en brèche cette manière de voir et tendent à démontrer que les cils sont bien de véritables prolongements du protoplasma, pouvant sortir par de fins orifices de la membrane.

Le nombre et la disposition de ces organes sont variables chez les différentes espèces qui en présentent. Les formes sphériques n'en auraient jamais qu'un; les coccus réunis par couple en auraient un à chaque pôle libre (fig. 19, *1*). Les formes en bâtonnets peuvent n'en présenter qu'un, à une extrémité (*Spirillum rugula*, fig. 19, *2* ; *Spirille du choléra*, fig. 24), ou deux, un à chaque bout (*Bacillus subtilis*, fig. 19, *3*), ou plus souvent même alors répartis sur toute la surface (fig. 20 et 25). Les Bactéries en spirale en possèdent tantôt un seul à chaque extrémité (*Spirillum undula*, fig. 19, *2*, et fig. 21), tantôt plusieurs en bouquet d'un côté ou des deux (formes spiralées des Sulfuraires roses, fig. 19, *4* ; *Spirillum undula*, fig. 21 ; *Spirilles du choléra*, fig. 24). Beaucoup d'espèces en ont de 10 à 15 ; le *Vibrion septique* et le *Bacille du charbon symptomatique* en ont de 20 à 40 ; le *Bacille du tétanos*, de 50 à 100 (fig. 26) ; le *Proteus vulgaris* souvent plus de 100 (fig. 25). Le nombre des cils n'influe pas sur la motilité.



Fig. 26. — *Bacille du tétanos* avec cils vibratiles.

Chez quelques espèces, le *Bacille du charbon symptomatique*, par exemple, on peut trouver sur quelques bâtonnets de véritables torsades, parfois très longues et très épaisses, qui seraient formées de cils appartenant à plusieurs bâtonnets, arrachés à un moment donné ; le nom de *cils composés*, qui a été proposé pour ces formations (2), ne peut évidemment pas leur être appliqué, si leur mode de production est tel qu'il vient d'être exposé.

Quand les cils n'existent qu'à une extrémité, cette extrémité est souvent postérieure dans le mouvement.

Lorsque les cellules sont unies en chaînes, les éléments qui se trouvent aux deux bouts sont seuls munis de cils vibratiles à leurs extrémités libres. Ce sont du reste les seuls qui se meuvent activement ; les autres suivent simplement l'impulsion qu'ils donnent. Lors de la séparation des éléments unis, les cils apparaissent aussitôt. Ces organes sont d'une grande fragilité ; le moindre heurt suffit pour les casser.

La longueur des cils est très variable par rapport à la longueur de l'élément qui les porte ; elle peut être inférieure, égale ou beaucoup supérieure.

A la contractilité de la masse protoplasmique doit être uni un certain

(1) Fischer, Untersuchungen über Bakterien (*Jahrb. für wiss. Bot.*, Bd. XXVII).
(2) Malvoz, Sur les cils composés (*Ann. de l'Inst. Pasteur*, 1902, IX, p. 686).

degré de flexibilité de la membrane lui permettant de suivre les mouvements, flexibilité des plus marquée chez certaines espèces, particulièrement les anciens Spirochètes. Si, au contraire, la membrane est rigide, elle emprisonne parfaitement la partie mobile et empêche ainsi toute manifestation extérieure de sa contractilité, qui, on le sait, est une des propriétés inhérentes à tout protoplasma; la Bactérie est immobile ou se meut uniquement à l'aide de cils, tout en restant rigide. De plus amples détails seront donnés plus loin, lors de l'étude des procédés de coloration des cils.

D'après Rossi (1), les cils joueraient un rôle important dans le phénomène de l'agglutination; ils traversent facilement les bougies assez poreuses, comme la Berkefeld V.

La disposition des cils sur les éléments peut servir à établir des coupes parmi les Bactéries. En prenant leurs caractères comme base, Messea (2) a proposé la classification suivante :

I. *Gymnobactéries :* Espèces dépourvues de cils.
II. *Trichobactéries :* Espèces munies de cils.
  1. *Monotriches :* Espèces à un seul cil placé à un des pôles. Ex. : *Spirille du choléra* (fig. 24).
  2. *Lophotriches :* Espèces munies d'un faisceau de cils à un des pôles. Ex. : *Bacille du lait bleu.*
  3. *Amphitriches :* Espèces munies de cils aux deux pôles. Ex. : *Spirillum undula* (fig. 21).
  4. *Péritriches :* Espèces ayant des cils sur toute la surface du corps. Ex. : *Proteus vulgaris* (fig. 25).

Si ces caractères ne paraissent pas suffisants pour établir une classification générale, ils n'en sont pas moins précieux et commodes pour la distinction et la description des espèces et les dénominations à conserver.

CHAPITRE DEUXIÈME

BIOLOGIE DES BACTÉRIES

I. — FONCTIONS DES BACTÉRIES

1. RESPIRATION

Comme tous les êtres vivants, les Bactéries ont un besoin absolu d'oxygène. Elles peuvent prendre ce gaz dans l'air, dissous dans le milieu nutritif, ou à l'état de combinaison peu stable avec certaines substances. Si, par exemple, on colore du lait en bleu à l'aide de quelques gouttes de solution de carmin d'indigo, et qu'on y sème des Bactéries communes de l'air ou de l'eau, on verra le liquide se décolorer,

(1) Rossi, Sui phenomeni di agglutinazione dei Batteri (*Arch. per le Sc. med.*, XXVIII, 1904).

(2) Messea, Contribuzione allo studio delle ciglia dei batteri e proposta di una classificazione (*Rivista d'Igiene*, I, 1890).

au fur et à mesure du développement des organismes dans sa masse ; le carmin d'indigo est réduit par les Bactéries qui lui prennent son oxygène (1). En agitant le liquide à l'air, la coloration bleue réapparaît, indice de la pénétration d'oxygène. La *Bactérie du charbon*, se développant dans le sang, enlève l'oxygène à l'oxyhémoglobine et cause ainsi l'asphyxie des tissus ; le sang, désoxygéné, prend alors la teinte noirâtre caractéristique.

Il est facile de se rendre compte, par l'examen direct, de ce besoin d'oxygène. Dans une préparation, faite avec une goutte de culture de Bactéries mobiles, *Bacillus subtilis* ou *Bacterium termo*, par exemple, ou, plus simplement, avec une goutte de macération végétale ou animale où ces formes abondent, on voit, au bout de très peu de temps, toutes les Bactéries mobiles se rapprocher des bords de la lamelle et y former un liséré épais. C'est que là l'oxygène arrive en abondance. Si on lute la préparation à la cire ou à la paraffine, qui empêchent totalement l'accès de l'air, les Bactéries s'amassent autour des bulles d'air que peut contenir le liquide. Après quelques instants, le mouvement cesse au centre, pour ne plus se montrer qu'aux abords des endroits où peut arriver l'air. Dès que l'oxygène manque totalement, ces éléments, très mobiles tout à l'heure, tombent dans un état de mort apparente, qui sera bientôt suivie d'une perte totale de la vie, si la privation d'oxygène continue.

Engelmann (2) a donné une très jolie preuve de cette avidité pour l'oxygène que possèdent certaines espèces. En faisant tomber un spectre microscopique à l'aide d'un appareil spécial, son *microspectral-objectif*, sur un filament d'Algues vertes que l'on trouve communément dans l'eau, on voit les Bactéries en suspension dans le liquide s'accumuler en deux endroits contre le filament vert. Le plus fort amas est dans le rouge, entre les raies B et C de Fraunhofer ; on trouve un second groupement moins considérable dans la partie la plus réfrangible au delà de la raie F. C'est en effet à ces deux endroits que se trouvent les bandes d'absorption du pigment chlorophyllien et où se limite, dans le spectre, le mode d'activité de ce pigment, décomposition de l'acide carbonique, assimilation du carbone et dégagement de l'oxygène.

Les Bactéries emploient cet oxygène, comme le font toutes les cellules vivantes. Il sert à oxyder, brûler certains principes du protoplasma ; d'où dégagement de forces vives, en rapport direct avec la chaleur produite par la combinaison. Le résidu est de l'acide carbonique, qui se dégage et dont la présence est toujours facile à constater, et de l'eau, qui se mélange au milieu ambiant.

Dans certains cas, l'action est beaucoup plus complexe ; l'absorption d'oxygène est très considérable. L'espèce l'emploie, en outre, à oxyder directement une grande partie de l'aliment dont elle dispose ; il se forme ainsi un composé nouveau, qui doit être rejeté au dehors de la cellule parce qu'il nuirait à son fonctionnement. La Bactérie de la *Mère de vinaigre*, vivant à la surface de liquides alcooliques, transforme rapide-

(1) Duclaux, Mémoires sur le lait (*Ann. de l'Inst. agron.*, 1882) et Chimie biologique, p. 108. — Voy. aussi : Le lait, étude chimique et microbiologique, 2e édit. Paris, J.-B. Baillière, 1894, 1 vol. in-16.

(2) Engelmann, Ueber Sauerstoffausscheidung von Pflanzezellen im Mikrospectrum (*Arch. für die gesammte Physiol.*, 1882, Bd. XXVII, p. 485).

ment de grandes quantités d'alcool éthylique en acide acétique. Les *Bactéries nitrifiantes* oxydent l'azote des composés ammoniacaux du sol, et forment des nitrates.

A côté de ces espèces qui ne peuvent vivre sans oxygène libre, ces *aérobies*, comme les a nommées Pasteur, il s'en trouve d'autres qui non seulement n'ont pas besoin, pour se développer, de trouver de l'oxygène gazeux dans leur milieu, mais que la présence de ce gaz libre semble empêcher de végéter ou tuer. Pasteur les a appelées *anaérobies* (1). On peut citer comme type son *Vibrion butyrique*, le *Bacillus butyricus*. Le liquide qui subit la fermentation lactique contient, au bout de peu de temps, une quantité de bâtonnets épais et courts de *Bacillus lacticus*. L'espèce, qui est *aérobie*, trouble uniformément la masse. Lorsque tout l'oxygène du liquide est enlevé, les bâtonnets tombent en état de vie latente, et s'amassent au fond du liquide en un dépôt plus ou moins épais; il n'en reste en vie active que dans la couche supérieure du liquide, interceptant l'oxygène au passage et empêchant sa diffusion dans les couches sous-jacentes. Alors se développe une autre espèce, manifestement *anaérobie*, qui n'attendait pour se montrer que cette disparition d'oxygène : c'est le *Bacillus butyricus,* agent de la fermentation butyrique type. L'aspect des organismes que l'on trouve dans le liquide est tout autre : ce sont de grands bâtonnets, ayant une longueur trois fois grande comme celle des précédents et une largeur en proportion. Les phénomènes qui se passent dans le milieu sont aussi bien différents. Il se produit une active production de gaz et une forte odeur d'acide butyrique.

Si l'on examine une goutte de ce dernier liquide, les phénomènes observés sont inverses de ceux que nous ont présentés les *aérobies*. Là où il y avait la vie, est la mort et réciproquement. Les bâtonnets fuient les places où ils peuvent être atteints par l'air ; dans ces endroits, leur mouvement cesse, ils viennent en vie latente ou meurent. La vitalité ne continue à se montrer qu'au centre de la préparation, où l'oxygène ne peut diffuser. Les mêmes phénomènes apparaissent si l'on fait barboter de l'air dans le liquide précédent, en pleine fermentation butyrique.

Il est encore difficile de donner une explication bien nette de ce phénomène, qui semble si anormal à première vue. Les recherches déjà anciennes de Pasteur montrent qu'il y a un lien intime entre la vie sans air et la fermentation provoquée. Les *anaérobies* paraissent tous être des agents énergiques de la transformation des matières organiques ; c'est précisément grâce à l'énergie de leur pouvoir d'attaque, due, comme nous le verrons, à leur sécrétion de diastases très actives, qu'il leur devient possible de se passer d'oxygène libre en utilisant dans une certaine mesure l'oxygène entré en combinaison. Il y a, en effet, entre la vie sans air et la vie à l'air ce rapport tout intime qui montre que ce ne sont là que deux formes d'un même processus fondamental, que les mêmes produits sont directement utilisés par le protoplasma vivant. L'oxygène, toujours nécessaire, peut être pris directement dans le milieu ambiant où il se trouve à l'état libre, ou bien emprunté à une combinaison d'où peut le dégager l'activité protoplasmique spéciale. Il est dans

(1) Pasteur, Infusoires vivant sans gaz oxygène libre (*C. R. de l'Acad. des sc.,* LII, 1861), et Études sur la bière, 1876, p. 282.

les deux cas utilisé de la même façon générale, comme le prouve la formation du même composé final, l'acide carbonique.

Si les cellules végétatives des espèces anaérobies sont aussi sensibles à l'action nuisible de l'oxygène, il n'en est pas de même des organes reproducteurs, des spores. Celles-ci peuvent supporter, en effet, sans être influencées, le contact, même prolongé, de l'air ; peut-être même ce contact est-il nécessaire à leur développement futur, ce qui serait un lien de plus entre les aérobies et les anaérobies. La spore, toutefois, portée dans un milieu nutritif, ne peut germer qu'en l'absence totale d'oxygène.

Entre les espèces dont la moindre trace d'oxygène empêche le développement, et celles qui ont un besoin absolu de ce gaz, s'en trouvent d'autres, assez nombreuses, qui présentent sous ce rapport une indifférence assez complète et font en quelque sorte transition. Les premières étant des *anaérobies vrais* ou *obligés*, ces dernières sont des *anaérobies facultatifs*. Elles se développent au mieux en présence de l'air, mais végètent quand même, bien que souvent faiblement, dans un milieu complètement dépourvu d'oxygène, sans paraître y provoquer de réactions particulières. Le *Bacille typhique*, le *Micrococcus de la mammite gangreneuse* de Nocard (1) en sont d'excellents exemples.

Il existe, du reste, entre les organismes aérobies et les organismes anaérobies, toute une série d'intermédiaires dont l'étude peut jeter une grande lumière sur la physiologie des anaérobies qui apparaît encore si obscure. Bien des Levures peuvent emprunter l'oxygène, soit à l'air en nature ou dissous dans le milieu nutritif, soit à des combinaisons oxygénées plus ou moins stables. Schützenberger a démontré que la *Levure de bière* enlevait très facilement l'oxygène à l'oxyhémoglobine, faisant passer le sang artériel rouge à l'état de sang veineux noir. Ces Levures peuvent emprunter cet oxygène à des composés plus complexes, les sucres ; cette soustraction d'oxygène détermine alors des modifications moléculaires importantes qui constituent la partie fondamentale du processus de la fermentation ; la Levure qui devient ferment vit réellement en anaérobie. On peut imaginer facilement qu'un tel caractère devienne, chez certaines espèces, tout à fait définitif et prédominant ; des types d'anaérobies seront produits.

Du reste, on peut admettre que les éléments d'organismes supérieurs sont de vrais anaérobies. Ils ne peuvent pas utiliser l'oxygène libre, mais seulement l'oxygène en combinaison, combinaison peu stable, il est vrai, l'oxyhémoglobine. Les microbes anaérobies, éléments plus dissociés d'un même tout, n'en diffèrent que parce qu'ils peuvent ou doivent prendre leur oxygène à des composés plus stables ; mais ce n'est là qu'une question de degré, se trouvant sous la dépendance de production de corps oxydants plus énergiques.

Ces données sur l'*aérobiose* et l'*anaérobiose*, que l'on a considérées longtemps comme classiques, ont été fortement battues en brèche par des travaux récents, principalement ceux de Tarozzi (2), de Wrzosek (3),

(1) Nocard, Sur la mammite gangreneuse des brebis laitières (*Ann. de l'Inst. Pasteur*, 1888, n° 9).

(2) Tarozzi, Ueber ein leicht in aërober Weise ausführbares Kulturmittel von einigen bis jetzt für strenge Anaeroben gehaltenen Keimen (*Centralbl. für Bakt.*, Originale, XXXVIII, 1905, p. 619).

(3) Wrzosek, Weitere Untersuchungen über die Züchtung von obligatorischen Anaëroben in aërober Weise (*Ibid.*, XLIV, 1907, p. 607).

de Pfuhl (1) et surtout de G. Rosenthal (2), qui démontrent qu'il est très possible de faire vivre des anaérobies obligés types en véritables aérobies, à l'aide de certaines méthodes, et même, comme l'a obtenu G. Rosenthal, de transformer un de ces types en un type aérobie vrai. Évidemment, il ne s'agit pas ici du *transformisme* d'une espèce, mais simplement d'un changement dans ses propriétés vitales, processus dont on connaît beaucoup d'exemples par rapport à plusieurs de ces propriétés, telle, par exemple, l'obtention de types achromogènes, avirulents, aux dépens d'un type chromogène ou virulent. Il faut donc éviter, pour de tels dérivés, l'emploi du terme espèce. Ces types dérivés paraissent même fixés à tel point qu'ils peuvent se reproduire identiques par sporulation. On se trouve alors en présence de deux microbes, l'un représentant le type habituel, anaérobie avec ses propriétés regardées comme normales, l'autre, le type dérivé, aérobie, ayant dépouillé une grande partie des propriétés biologiques du premier, mais toutefois pouvant en avoir conservé de très caractéristiques, peut-être même spécifiques, comme l'agglutination par le sérum spécifique, qui permettent d'affirmer sa véritable nature. De plus, par une durée souvent longue de vie en anaérobiose maintenue expérimentalement, il est possible d'obtenir le retour au type ordinaire, anaérobie, avec récupération complète des propriétés biologiques, surtout la virulence pour les espèces pathogènes.

La transformation d'anaérobie en aérobie ne s'observe pas brusquement, mais au contraire lentement, progressivement, par étapes. Chez le *Vibrion septique*, le *Bacille du tétanos*, le *Bacillus perfringens*, Rosenthal décrit trois phases successives dans l'aérobisation, à chacune desquelles il est possible de fixer le microbe en faisant cesser l'action des conditions actives. Dans une première phase, à part le pouvoir de végéter en présence d'oxygène, le microbe reste lui-même, conservant toutes ses fonctions, sauf une légère atténuation dans son pouvoir pathogène. Une seconde phase est caractérisée par la disparition progressive, en cultures aérobies, de tous les caractères biologiques spéciaux, chimiques, fermentatifs et pathogènes, qui persistent au contraire intégralement dans les cultures anaérobies provenant d'un même ensemencement, au point que ces dernières peuvent reconstituer entièrement le type originel. Dans une troisième étape de la vie aérobie, on observe la perte définitive des caractères biologiques qui ont entièrement disparu, aussi bien en cultures anaérobies qu'en cultures aérobies, et il peut n'être plus possible de les faire réapparaître. Parfois cependant, ce qui est bien probant, le retour au type primitif peut s'obtenir, avec des inoculations massives en série chez les animaux ou une longue suite de cultures anaérobies.

Dans ces phénomènes, la question de composition du milieu peut avoir une réelle importance. Il semble que la présence de certains aliments, de certaines substances, diminue l'action nocive de l'oxygène sur les anaérobies vrais, à tel point que ces microbes arriveraient en quelque sorte à s'y accoutumer progressivement et à pouvoir vivre en aérobies.

(1) Pfuhl, Die Züchtung anaërober Bakterien in Leberbouillon, sowie in Zuckerbouillon und in gewöhnlichem Bouillon mit einem Zuzatz von Platinschwamm oder Hepin unter Luftzutritt (*Centralbl. für Bakt.*, XXIV, 1907, p. 378).

(2) G. Rosenthal, L'aérobisation des microbes anaérobies. Paris, Alcan, 1908.

Tarozzi emploie des milieux auxquels il ajoute des fragments de tissus frais d'animaux sains, surtout foie, rate, reins, ganglions. Il peut même suffire de plonger dans du bouillon un tel fragment que l'on retire aussitôt pour que ce milieu devienne apte à donner une culture d'un anaérobie. Cette particularité ne s'observerait ni avec le tissu conjonctif, ni avec le sang, le sérum, le lait. Elle persiste dans un tube de bouillon porté à 100° pendant quelques minutes, mais après cinq minutes a disparu. D'après Wrzosek, le même phénomène s'observerait avec beaucoup de tissus animaux ou végétaux, frais ou desséchés, avec des fragments de graines, même avec des tissus carbonisés, du charbon de bois, du coke; il conclut que ce qui agit dans la circonstance c'est la présence d'une substance réductrice. Harrass (1) réussit en préparant du bouillon avec une macération de foie : Pfuhl en ajoutant à du bouillon ordinaire de la mousse de platine ou une catalase, l'hépine.

Rosenthal obtient l'aérobisation en habituant progressivement l'anaérobie au contact de l'oxygène, soit par gamme ascendante de pression en faisant des cultures dans le vide relatif de moins en moins prononcé, soit par gamme descendante de hauteur en le cultivant dans des tubes de culture de moins en moins profonds.

Le phénomène inverse, la transformation d'un aérobie en anaérobie, paraît aussi pouvoir s'obtenir dans des conditions similaires. D'anciennes observations de Naegeli, puis de Nencki, montrent que diverses Bactéries de fermentation, aérobies habituels, peuvent très bien vivre sans oxygène, si elles se trouvent dans une solution appropriée, apte à fermenter, mais que ces mêmes espèces ne peuvent plus se développer qu'en présence d'oxygène si elles n'ont à leur disposition qu'un liquide nutritif moins favorable. Rosenthal (2) a observé que le *Bacille du charbon*, aérobie vrai, pouvait se transformer progressivement en anaérobie facultatif, soit en l'habituant à supporter des vides de plus en plus forts, soit en le cultivant dans un milieu dont la surface est de mieux en mieux protégée du contact de l'oxygène. En anaérobiose, il perd sa propriété de sporuler et voit sa vitalité diminuer ; à part cela, dans une première série de cultures (premier stade d'anaérobisation) il garde ses fonctions biologique, chimique et pathogène. C'est aussi une véritable adaptation d'aérobies à la vie anaérobie qu'ont mis en jeu Charrin et de Nittis (3), puis Vincent (4) quand ils sont parvenus à conférer de la virulence au *Bacillus subtilis* et au *Bacillus megaterium*.

Il semble bien résulter de tout ceci qu'entre les organismes aérobies et les organismes anaérobies il n'y aurait pas de différences capitales, essentielles, mais de simples différences de degré, et que la meilleure conception est celle de Beijerinck (5) qui classe comme *aérophiles* tous les microbes qui recherchent ou préfèrent la tension maxima d'oxygène

(1) Harrass, *Münchener med. Wochenschr.*, 1906, n° 46.

(2) G. Rosenthal, L'anaérobisation du Bacille du charbon (*Soc. de l'internat des hôpitaux de Paris*, 7 juillet 1906).

(3) Charrin et de Nittis, Un *Bacillus subtilis* pathogène (*Soc. de biol.*, 17 juillet 1897).

(4) Vincent, Sur les aptitudes pathogènes des microbes saprophytes (*Ann. de l'Inst. Pasteur*, XII, 1898, p. 785).

(5) Beijerinck, Les organismes anaérobies ont-ils besoin d'oxygène libre ? (*Arch. néerlandaises*, 2e série, t. II, 1899, p. 397).

et *microaérophiles* ceux qui réclament une faible tension de ce gaz, tels les anaérobies dits jusqu'ici obligés.

Les microbes anaérobies paraissent être très répandus dans la nature et jouer un grand rôle dans la transformation de la matière organique. Ils peuvent vivre facilement dans le milieu extérieur, grâce à la présence à leurs côtés de nombreuses espèces aérobies qui enlèvent l'oxygène du milieu et le rendent habitable pour les anaérobies. Ils interviennent très activement dans la putréfaction des matières organiques en donnant un dégagement d'acide carbonique, d'hydrogène et d'hydrocarbures et formant souvent des corps odorants.

Ils occasionnent bien des processus de fermentation ; les *Bacilles butyriques*, *B. amylobacter*, *B. amylozyma*, *B. orthobutylicus*, *B. gracilis ethylicus* rentrent dans cette catégorie. Beaucoup sont des agents énergiques de décomposition des albuminoïdes, surtout le *Bacillus putrificus coli*, le *Bacillus bifidus*, le *Tyrothrix claviformis*, les *Micrococcus magnus* et *M. anaerobius*.

Beaucoup ont une action pathogène marquée ; leur importance en pathologie humaine et animale augmente tous les jours, surtout depuis que des facilités de technique permettent de les rechercher plus aisément et de les étudier de plus près. Sous ce rapport, les travaux de Veillon et de plusieurs de ses élèves ont été des plus précieux, en montrant que certaines de ces espèces jouent un rôle considérable dans les suppurations putrides et les processus gangreneux. Le *Vibrion septique* de Pasteur, un des plus anciennement connus et des plus répandus, doit toujours être cité au premier rang; puis le *Bacille du tétanos* et le *Bacille du charbon symptomatique* ; le *Bacillus perfringens* et les espèces bien voisines, *Bacillus enteritidis sporogenes*, *Bacille du phlegmon gazeux*, le *Bacillus botulinus*, les *Bacillus serpens*, *B. ramosus*, *B. fragilis*, *B. thetoides*, *Micrococcus parvulus*, *M. fœtidus*, *Spirillum nigrum*, des pus fétides ou des suppurations gangreneuses. Cette liste s'accroîtra certainement encore.

D'après les résultats obtenus par Rosenthal, il est permis de penser qu'il n'est pas impossible d'arriver à rencontrer dans la nature le type anaérobie et un type aérobie plus ou moins parfait d'une même espèce, types que la morphologie ou la persistance de l'un ou l'autre des caractères biologiques permettraient d'identifier. A ces types aérobies, neutralisés, privés de tout ou partie de leurs fonctions, Rosenthal propose de donner le nom de *bacillogènes*, les considérant comme la forme primitive, la véritable espèce, saprophyte alors, qui, transportée dans un milieu très pauvre en oxygène, s'est progressivement adaptée, comme le font le *Bacillus subtilis* et le *Bacillus megaterium*, à des conditions nouvelles, à la vie anaérobie.

D'autres détails seront encore donnés plus loin à *Culture des anaérobies* et lors de la description des différentes espèces.

2. NUTRITION

Toute cellule vivante doit trouver, dans le milieu où elle évolue, de quoi compenser les pertes occasionnées par les actes vitaux, et même de quoi augmenter sa masse, en parties actives ou en réserves. Il lui faut, pour vivre, des *aliments*.

Ces aliments doivent nécessairement renfermer les corps simples qui entrent, sous des groupements divers, dans la constitution du corps de la cellule. Il en est des Bactéries, sous ce rapport, comme de tous les autres êtres vivants, animaux ou plantes. Une petite partie de la masse cellulaire est constituée par des composés ternaires : c'est de la cellulose, de la matière amylacée, des sucres, le tout imprégné d'une forte quantité d'eau. Les éléments chimiques qui dominent sont donc le carbone, l'hydrogène et l'oxygène (1). Le protoplasma, et souvent même la membrane, contiennent des matières albuminoïdes ; il faut donc fournir en outre de l'azote et accessoirement du soufre et du phosphore. On y rencontre aussi des matières grasses. A côté de cela, l'analyse révèle la présence d'un certain nombre d'éléments, considérés comme secondaires, parce que leur action est peu connue, pour ne pas dire complètement ignorée. Ce sont eux qui restent à l'incinération et qu'on désigne sous le nom général de *substances minérales*. De bons renseignements sont fournis par la composition chimique des Bactéries.

Composition chimique des Bactéries.

L'analyse élémentaire a donné à Cramer (2), pour le *Pneumobacille de Friedländer* et trois microbes voisins, la moyenne suivante :

Carbone	51,07
Hydrogène	6,64
Azote	13,46
Cendres	9,16

Nishimura (3) a obtenu les chiffres suivants :

	Bacille de la tuberculose.	Bacille de la diphtérie.
Carbone	51,62	51,21
Hydrogène	8,07	9,02
Azote	9,09	11,7
Soufre	»	1,45
Phosphore	»	0,67
Cendres	8,00	»

Cramer (4) a du reste démontré que ces chiffres, surtout celui de l'azote, pouvaient varier dans d'assez larges limites pour une même espèce, — et il a surtout expérimenté sur le *Spirille du choléra*, — suivant la valeur nutritive du milieu.

La proportion d'eau est toujours assez élevée ; différentes analyses donnent une moyenne de 84 à 85 p. 100, pour 15 à 16 p. 100 de résidu sec.

D'après Nicolle et Alilaire (5), la proportion d'eau, dans quinze espèces étudiées, varierait entre 73 et 84 p. 100, l'azote total de 8,5 à 10,5 p. 100 en poids sec.

(1) Hesse, Ueber die gasförmigen Stoffwechselproducte beim Bacterien (*Zeitschr. für Hygiene*, 1893, XV, p. 17).

(2) Cramer, Die Zusammensetzung der Bakterien (*Arch. für Hygiene*, 1893, XVI, p. 151).

(3) Toyosaku Nishimura, Untersuchung über die chemische Zusammensetzung eines Wasserbacillus (*Arch. für Hygiene*, 1893, XVIII, p. 318).

(4) Cramer, Die Zusammensetzung der Cholerabacillen (*Arch. für Hygiene*, 1895, XXII, p. 167).

(5) Nicolle et Alilaire, Note sur la production en grand des corps bactériens et sur leur composition chimique (*Ann. de l'Inst. Pasteur*, XXIII, 1909, p. 547).

Nishimura donne, pour le Bacille de l'eau qu'il a étudié, la composition suivante du résidu sec :

Albumine....	63,5	p. 100
Hydrocarbonés	12,2	—
Extrait alcoolique	3,2	—
Extrait éthéré	5,1	—
Cendres	11,2	—
Lécithine	0,68	—
Xanthine	0,14	—
Guanine	0,17	—
Adéniné	0,08	—

L'auteur signale en outre des traces d'urée, déjà rencontrée par Duclaux dans des ferments des albuminoïdes.

Cramer donne pour le *Pneumobacille de Friedländer*, sur culture à l'infusion de viande, dans des conditions différentes, les chiffres suivants pour 100 de résidu sec :

	Avec 1 p. 100 peptone.	Avec 5 p. 100 peptone.	Avec 1 p. 100 peptone et 5 p. 100 glucose.
Albumine	71,7	79,8	63,6
Extrait alcoolique éthéré.	10,3	11,28	22,7
Cendres	13,94	10,36	7,88

Pour le *Spirille du choléra*, le même auteur a remarqué que la quantité de matière albuminoïde variait, pour une même race, de 45 à 65 p. 100 du résidu sec, suivant que la culture était faite en milieu minéral (liquide d'Utchinsky) ou en bouillon de viande, les cendres variant de 11 à 31 p. 100 dans les mêmes conditions. Le chiffre de l'albumine est obtenu en multipliant la quantité d'azote trouvée par 6,25 : il y a certainement là quelque inexactitude, comme le fait remarquer judicieusement Duclaux (1).

D'après Hammerschlag (2), le *Bacille tuberculeux*, lavé et séché, abandonne en moyenne 27 p. 100 de son poids à un mélange d'alcool et d'éther; l'extrait obtenu par évaporation est formé d'un mélange de matière grasse, tripalmitine et tristéarine, et de lécithine. Le résidu se dissout dans l'acide sulfurique concentré en donnant une solution qui réduit la liqueur de Fehling, ce qui pourrait être dû à une substance cellulosique. La proportion d'extrait éthéro-alcoolique est très élevée chez cette espèce, qui contient beaucoup de matières grasses, comme l'ont montré également d'autres observateurs (3). D'après Aronson (4), cet extrait contiendrait une forte proportion d'une matière cireuse.

Pour le *Bacille tuberculeux*, Kressling (5) donne comme composition de la masse bacillaire séchée :

Humidité (dessiccation à 100°-110°)	3,9375	p. 100
Cendres	2,55	—
Azote	8,575	—

(1) Duclaux, Traité de microbiologie, I, p. 168.

(2) Hammerschlag, Bakteriologische chemische Untersuchungen über Tuberkelbacillen (*Centralbl. für klin. Med.*, 1891, p. 1).

(3) Schweinitz et Dorset, Further notes upon the fats contained in the tuberculosis bacilli (*Centralbl. für Bakt.*, 1 Abth., XIX, p. 707).

(4) Aronson, Zur Biologie der Tuberkelbacillen (*Berlin. klin. Woch.*, 1898, n° 22).

(5) Kressling, Ueber die Fettsubstanz der Tuberkelbacillen (*Ibid.*, XXX, 1901, p. 896). — *Arch. des sc. biol.*, 1903, p. 359.

Substances albuminoïdes	53,59 p. 100	
Substances grasses	38,95	—
Substances non azotées (dosées par différence)	0,9725	—

Schweinitz et Dorset (1) donnent pour les cendres de cette même espèce la composition minérale suivante :

Soude	12,62 p. 100.	
Potasse	6,35	—
Chaux	12,64	—
Magnésie	11,55	—
Acide carbonique et silice	0,57	—
Acide phosphorique	55,23	—

A remarquer la forte proportion d'acide phosphorique et l'absence d'autres radicaux acides.

Ditthorn et Wœrner (2) donnent pour le *Méningocoque* la constitution suivante :

Graisse	5,44 p. 100	
Lécithine	1,62	—
Protéine	55,64	—
Substance non azotée	36,80	—

Leach (3) a trouvé dans le *Bacillus coli communis*, cultivé sur gélose, simplement coagulé par l'alcool, 8,5 p. 100 de cendres, formées surtout de phosphates de sodium et de potassium, avec un peu de calcium, d'aluminium et de cuivre, sans magnésium, sans sulfates et chlorures ; les corps microbiens renfermaient environ 3 p. 100 de phosphore. Ces corps se dissolvent complètement par traitements successifs avec les acides et les alcalis dilués. L'extrait renferme des hydrates de carbone et des substances azotées riches en phosphore que Wheeler (4) signale aussi chez le *Bacille typhique*. Il n'y a pas de cellulose ni de composés similaires.

Les substances azotées paraissent être extrêmement complexes. C'est d'abord des albumines coagulables, des protéoses, des glycoprotéides et phosphoprotéides, puis leurs dérivés, nucléines, acides nucléiques ; de la xanthine, de la guanine, de l'adénine signalées par Nishimura, Galeotti (5), Wheeler (6) ; de l'urée d'après Duclaux ; des acides amidés, des produits de nature diastasique dont l'étude sera faite plus loin ; une substance voisine de la chitine ou de la kératine.

Comme hydrates de carbone, la cellulose est rare, peut-être exceptionnelle (p. 22) ; la matière amylacée rare ou problématique ; les sucres sont mal caractérisés : c'est du glycogène ou des dérivés provenant de la destruction des protéides ; Bendix (7) signale du pentose chez le *Bacille tuberculeux* et certains Bacilles des matières fécales.

(1) Schweinitz et Dorset, The mineral constituents of the tubercle bacilli (*Centralbl. für Bakt.*, 1 Abth., XXIII, 1898, p. 993).

(2) Ditthorn et Wœrner, Beitrag zur Kenntniss der chemischen Zusammensetzung des Meningococcus (*Hyg. Rundschau*, XIX, 1909, p. 1).

(3) Leach, On the Chemistry of Bacillus coli communis (*Journ. biol. Chemistry*, I, 1906, p. 463, et II, 1907, p. 443).

(4) Wheeler, The action of mineral acid on the cellular substance of Bacillus typhosus (*Studies from the Rockefeller Inst. for med. Research.*, III, 1905, n° 3).

(5) Galeotti, Beitrag zur Kenntniss der bacteriellen Nucleoproteiden (*Zeitschr. für phys. Chemie*, XXV, 1898, p. 48).

(6) Wheeler, The Chemistry of Sarcina lutea (*Rockefeller Inst.*, I, 1904).

(7) Bendix, Zur Chemie der Bakterien (*Deutsche med. Wochenschr.*, 1901, n° 2, p. 18).

Les matières grasses et cireuses peuvent être très abondantes. Pour le *Bacille tuberculeux*, Hammerschlag les évalue à 27 p. 100 du poids sec, Schweinitz et Dorset jusqu'à 37 p. 100, Nicolle et Alilaire 39 p. 100. Il y a, sous ce rapport, de grandes variations suivant les espèces : Aronson (1) donne de 3 à 5 pour le *Bacille diphtérique*, Ditthorn et Wœrner 5,44 pour le *Méningocoque*. Les matières grasses sont des graisses neutres, des acides gras libres, acide palmitique, arachidique et laurique chez le *Bacille tuberculeux* d'après Bullock et Mac Leod (2), de la lécithine et autres graisses phosphorées.

Les proportions de beaucoup de ces composants paraissent, du reste, pouvoir considérablement varier suivant la nature et même l'âge des cultures.

La seule conclusion générale à retenir est la richesse des Bactéries en azote, en acide phosphorique et en potasse.

D'autres détails sur la composition chimique de la membrane et du protoplasma ont été donnés précédemment (p. 23 et 29) ; il est inutile d'y revenir.

Aliments.

Les Bactéries doivent donc trouver dans le milieu extérieur principalement le carbone, l'azote et les principes minéraux nécessaires ; l'oxygène et l'hydrogène sont unis aux précédents ou se trouvent dans l'eau ; accessoirement, elles ont besoin de petites quantités d'autres corps, le soufre et le phosphore surtout.

Les Bactéries, dépourvues de chlorophylle, ne peuvent guère, comme les plantes vertes, puiser leur *carbone* directement dans l'atmosphère. Beijerinck (3) décrit cependant deux Bactéries qu'il a rencontrées dans l'eau de mer, certaines eaux douces, la vase, qui auraient la propriété de réduire, à l'obscurite, l'acide carbonique dont elles utiliseraient le carbone. De là, nécessité pour les autres de le prendre à des composés complexes, formés par des êtres supérieurs. D'après Winogradsky (4), les Bactéries de la nitrification, capables de vivre et de pulluler dans un milieu exclusivement minéral, dépourvues de tout pigment assimilateur de carbone, emprunteraient leur carbone aux carbonates.

La source du carbone est, d'ordinaire, dans les substances ternaires, les sucres, l'amidon, la cellulose, la glycérine, l'acide tartrique, l'acide acétique, l'alcool éthylique, etc. Pour être assimilés, ces corps doivent subir des modifications importantes, sous l'influence de produits spéciaux, de nature diastasique, que nous étudierons plus loin.

Pour Söhngen (5), certaines espèces pourraient prendre le carbone au méthane, tel le *Bacillus methanicus*, qu'il a isolé de terre de jardin,

(1) ARONSON, Zur Biologie und Chemie der Diphteriebacillen (*Arch. für Kinderheilk*, XXX, 1902, p. 23).

(2) BULLOCK et MAC LEOD, The chemical constitution of the Tuberculose Bacillus (*Journ. of Hygiene*, IV, 1904, p. 1).

(3) BEIJERINCK, Ueber die Bakterien welche sich im Dunkeln mit Kohlensaüre als Kohlenstoffquelle ernähren Können (*Centralbl. für Bakt.*, 2te Abth., XI, 1904, p. 593).

(4) WINOGRADSKY, Morphologie des organismes de la nitrification (*Arch. des sc. biol. de Saint-Pétersbourg*, 1892).

(5) SÖHNGEN, Sur les Bactéries qui emploient le méthane comme nourriture carbonée et comme source d'énergie (*Arch. néerland. des sc. exactes et naturelles*, 2e série, XI, 1904, p. 307).

de purin, d'eaux croupies, gros bâtonnets mobiles de 4 à 5 μ, presque aussi larges, donnant sur les milieux liquides une pellicule rosée.

Très peu de Bactéries semblent pouvoir attaquer les *matières grasses*, qu'elles dédoublent alors en glycérine et acides gras (1). De Kruyff (2) a isolé de terres, d'eaux d'égouts et de rivières, plusieurs espèces aérobies hydrolysant et oxydant les graisses.

La principale source d'*azote* est le groupe des matières albuminoïdes. Les meilleurs de ces éléments azotés sont ceux qui sont très solubles et facilement diffusibles. Les peptones sont dans ce cas. Beaucoup d'espèces ont la propriété de transformer en peptones les albumines qu'on leur offre. Le fait, nécessaire à la digestion, est dû à la sécrétion de ferments particuliers, dont la production est en rapport tellement direct avec la fonction nutritive qu'ils ne sont formés par la cellule que lorsqu'ils sont nécessaires. Telle espèce, qui produira une quantité de ferment actif si on lui donne à consommer de l'albumine, n'en produira pas trace, nourrie avec des peptones. Les albumoses peuvent aussi être assimilées directement. Au second rang des substances azotées, assimilables pour les Bactéries, viennent les sels ammoniacaux et tout d'abord ceux à acide organique, lactate et tartrate d'ammoniaque surtout. L'urée est une bonne source d'azote ; certaines espèces semblent même en faire leur aliment de prédilection ; l'asparagine, la leucine, la tyrosine, la créatine qu'attaqueraient le *Proteus vulgaris*, et le *Bacillus fæcalis alcaligenes*, d'après Nawiasky (3), en fournissent aussi. Les nitrates (4), principalement ceux de potasse et de soude, peuvent aussi servir à la nutrition azotée, mais il faut qu'ils soient accompagnés d'une matière organique. Il peut en être de même pour l'urée ; d'après Richet (5), le *Micrococcus ureæ* ne produit bien la fermentation de l'urée que lorsqu'il trouve des matières albuminoïdes dans la solution. C'est peut-être pourquoi il n'y a fermentation ammoniacale dans la vessie que lorsqu'il y a inflammation de cet organe et production de mucine ou d'albumine.

Les Bactéries ne paraissent pas pouvoir utiliser l'azote du cyanogène ou de ses composés.

L'assimilation de l'azote gazeux de l'atmosphère par certaines Bactéries, et surtout des espèces du sol, est un fait acquis aujourd'hui ; il a une importance considérable au point de vue de la statique de la matière azotée sur le globe et pour les applications culturales. Les recherches de Berthelot (6), de Winogradsky (7), de Beijerinck, de Hellriegel et

(1) Rahn, Die Zersetzung der Fetten (*Centralbl. für Bakt.*, 2te Abth., XV, 1905, p. 53).

(2) De Kruyff, Les Bactéries hydrolysant et oxydant les graisses (*Bull. dép. de l'Agriculture aux Indes néerlandaises*, 1907).

(3) Nawiasky, Ueber die Ernährung einiger Spaltpilze in peptonhaltigen Nährböden (*Arch. für Hygiene*, LXIV, 1907, p. 33).

(4) Gayon et Dupetit, Sur la fermentation des nitrates (*C. R. de l'Acad. des sc.*, 1882, XCV). — Id., Sur la transformation des nitrates en nitrites (*Ibid.*, 1882, XCV, p. 1365). — Dehérain et Maquenne, De la réduction des nitrates dans les terres arables (*Ibid.*, 1882, XCV, p. 691, 732, 854). — Winogradsky, Recherches sur les organismes de la nitrification (*Ann. de l'Inst. Pasteur*, IV, 1890, nos 4 et 5).

(5) Richet, *C. R. de l'Acad. des sc.*, 1881, XCII, p. 730.

(6) Berthelot, Fixation de l'azote par les Microbes (*C. R. de l'Acad. des sc.*, 1892, CXV, p. 569, et 1893, CXVI, p. 842).

(7) Winogradsky, Recherches sur l'assimilation de l'azote libre de l'atmosphère par

Wilfarth ont démontré qu'il existe plusieurs espèces bactériennes jouissant à divers degrés de cette intéressante propriété, indépendamment d'autres organismes inférieurs, bien différents, Algues inférieures ou Mucédinées (1). Une des plus intéressantes, à ce point de vue, des espèces bactériennes connues, est celle qu'a isolée du sol Winogradsky ; il en fait un *Elostridium*, à cause de la propriété que présentent ses éléments en bâtonnets de se renfler en fuseau au moment de la formation des spores, et la dénomme *Clostridium Pasteurianum*. C'est une Bactérie anaérobie vraie, qui ne peut végéter dans le sol qu'à la condition d'être associée à des aérobies qui détournent d'elle l'oxygène. Il est parvenu à l'isoler en faisant des cultures successives dans des milieux totalement dépourvus d'azote combiné, en présence d'une atmosphère d'azote. C'est un ferment butyrique énergique.

Beijerinck a isolé, de terres cultivées et de diverses eaux, deux espèces aérobies capables d'assimiler l'azote gazeux, l'*Azotobacter chroococcum* et l'*Azotobacter agilis*. Hellriegel et Wilfarth avaient attribué aux Bactéries contenues dans les nodosités des racines des Légumineuses le pouvoir d'assimilation de l'azote gazeux reconnu à ces plantes ; Beijerinck (2) a pu isoler et cultiver l'espèce qu'il a dénommée *Bacillus radicicola* ; la fixation d'azote atmosphérique par ces microbes a été bien déterminée par Mazé (3). Löhnis (4) signale une assimilation d'azote libre, mais très faible, par le *Bacillus prodigiosus*, le *Bacillus pneumoniæ*, le *Bacillus lactis viscosus*, le *Bacillus fluorescens liquefaciens*, le *Bacillus lactis aerogenes* et le *Bacillus radiobacter* ; Jacobitz (5) par le *Bacillus megaterium* et le *Bacillus ellenbachensis* ; Bredemann (6), par le *Bacillus asterosporus*. Mais ce sont les *Clostridium* de Winogradsky et les *Azotobacter* de Beijerinck qui paraissent être les véritables microbes fixateurs d'azote, les autres ne possédant à ce point de vue qu'une action très faible, presque insignifiante.

La fixation par ces premières espèces d'une petite quantité d'azote demande par contre la consommation d'une très forte quantité de matière hydrocarbonée, de glucose par exemple.

Les Bactéries ont en outre besoin d'*éléments minéraux*, que l'on retrouve en quantités très notables dans leurs cendres. Les principaux

les Microbes (*C. R. de l'Acad. des sc.*, 1893, CXVI, p. 1385 ; 1894, CXVIII, p. 253). — Et : *Arch. des sc. biol. de Saint-Pétersbourg*, 1895, III, p. 297).

(1) Saida, Ueber die Assimilation freien Stickstoffes durch Schimmelpilze (*Bot. Centralbl.*, 1902, p. 565). — Schloesing et Laurent, Recherches sur la fixation de l'azote libre par les plantes (*Ann. de l'Inst. Pasteur*, 1892, VI, p. 67). — Bouilhac et Giustiniani, Sur les cultures de diverses plantes supérieures en présence d'un mélange d'Algues et de Bactéries (*Acad. des sc.*, CXXXVIII, 1904, p. 293). — Vogel, Die Assimilation des freien, elementaren Stickstoffes durch Mikroorganismen (*Centralbl. für Bakt.*, 2te Abth., XV, 1905, p. 33, 174 et 215, avec Bibliographie très complète).

(2) Beijerinck et von Delden, Ueber die Assimilation des freien Stickstoffs durch Bakterien (*Ibid.*, IX, 1902, p. 3).

(3) Mazé, Les microbes des nodosités des Légumineuses (*Ann. de l'Inst. Pasteur*, XI, 1897 ; XII, 1898, et XIII, 1899).

(4) Löhnis, Beitrag zur Kenntniss der Stickstoffbakterien (*Centralbl. für Bakt.*, 2te Abth., XIV, 1905, p. 582 et 713).

(5) Jacobitz, Die Assimilation de freien, elementaren Stickstoffes (*Centralbl. für Bakt.*, 2te Abth., VII, 1901, p. 783, 833, 876, avec Bibliographie complète de la question).

(6) Bredemann, Untersuchungen über die Variation und den Stickstoffbindung vermögen der Bacillus asterosporus (*Centralbl. für Bakt.*, 2te Abth., XXI, 1908).

sont le soufre, le phosphore, le potassium, le calcium, le magnésium, le chlore, le fer, le silicium.

L'importance des albuminoïdes et des matières ternaires, qui entrent dans le courant vital d'une façon déterminée, après avoir subi des modifications connues, est tout à fait hors de doute. Il n'en est pas de même du rôle des substances minérales. Les belles recherches de Raulin (1) sur le développement de l'*Aspergillus niger*, une des Moisissures les plus communes, ont jeté une vive lumière sur cette question. Ce Champignon se développe abondamment sur les tranches de citron, sur le pain mouillé d'un peu de vinaigre et, en général, sur tous les milieux à réaction acide, comme les autres Moisissures du reste. Raulin est arrivé à constituer un milieu purement minéral où, les conditions de temps, de lumière, de température, d'aération étant égales, la récolte de la plante est supérieure en poids à celle que fournit un quelconque des milieux habituels. Ce liquide nutritif, connu sous le nom de *liquide Raulin*, a la composition suivante :

Eau	1 500 grammes.
Sucre candi	70 —
Acide tartrique	4 —
Nitrate d'ammoniaque	4 —
Phosphate d'ammoniaque	0gr,60
Carbonate de potasse	0gr,60
— de magnésie	0gr,40
Sulfate d'ammoniaque	0gr,25
— de zinc	0gr,07
— de fer	0gr,07
Silicate de potasse	0gr,07

Si l'on vient à diminuer ou à supprimer l'un des sels de cette liste, même ceux qui n'entrent que pour une proportion très faible dans la solution, la récolte diminue dans des limites parfois très larges. La suppression du sel de zinc, qui n'entre que pour 7 centigrammes dans le liquide, donne une récolte qui ne représente, en poids, que le *dixième* de celle du liquide normal. Le résultat a été identique dans une nombreuse série de cultures. Dans un liquide sans potasse, la récolte tombe au 1/25e de la normale ; sans ammoniaque, au 1/150e ; sans acide phosphorique, au 1/200e. L'influence de ces éléments minéraux est indiscutable; le rôle qu'ils remplissent dans les réactions vitales est inconnu.

Il est même des espèces qui semblent mieux végéter dans des milieux fortement chargés de matières minérales, tels les microbes dits *chlorurophiles* par Le Dantec (2), ou ceux qui, d'après Lewandowsky (3), croissent encore dans des milieux contenant 25 p. 100 de sel.

D'autres espèces ne vivent bien que dans des milieux contenant de fortes proportions de fer qu'elles fixent souvent d'une façon spéciale, comme le *Leptothrix ochracea* (4).

(1) Raulin, Études chimiques sur la végétation. Recherches sur le développement d'une Mucédinée dans un milieu artificiel (*Ann. des sc. nat.*, *Bot.*, 1870).

(2) Le Dantec, Le microbe du rouge de morue ; note sur une nouvelle catégorie de microbes : les microbes chlorurophiles (*Soc. de Biol.*, LXI, 1906, p. 136).

(3) Lewandowsky, Ueber das Wachstum von Bakterien in Salzlösungen von hoher Konzentration (*Arch. für Hygiene*, XLIX, 1904, p. 47).

(4) Ellis, A contribution to our knowlidge of the thread-bacteria (*Centralbl. für Bakt.*, 2te Abth., XIX, 1907, p. 502).

Les Bactéries se contentent aussi très bien de solutions purement minérales. Elles y prospèrent moins bien, cependant, que dans les liquides tenant en dissolution des matières albuminoïdes. Pasteur a créé, le premier, un tel milieu artificiel. Depuis, d'autres formules ont été imaginées, répondant mieux à certaines exigences. La composition de plusieurs de ces solutions sera donnée plus loin.

Dans un mélange de substances alimentaires, une espèce ne s'adresse pas, sans choix, à la première venue, mais toujours à la forme la plus assimilable pour elle, à celle qui demande le moins de travail pour entrer dans la nutrition. Ce n'est que quand cette première substance est consommée qu'elle s'attaque à une seconde de digestion moins facile. Lorsqu'on donne, par exemple, au *Bacillus butyricus* à la fois du sucre et de la matière cellulosique, il consomme tout d'abord la provision sucrée et après, seulement, se nourrit de l'autre composé ternaire, qu'il doit modifier d'une façon beaucoup plus profonde pour pouvoir l'utiliser.

Le choix de l'aliment influe considérablement sur le développement de bien des espèces. Certaines peuvent croître tout en n'ayant à leur portée que des proportions d'aliments tellement minimes qu'elles échappent parfois à l'analyse. L'eau, même pauvre en matières organiques, est un milieu où beaucoup de Bactéries peuvent se multiplier abondamment. Le *Micrococcus aquatilis* et le *Bacillus erythrosporus*, d'après Meade Bolton (1), se développent très bien dans l'eau distillée ; il en est de même du reste de plusieurs Mucédinées. Dans ces conditions, le développement s'arrête au bout d'un certain temps, lorsque les aliments sont consommés jusqu'à la dernière trace ; les individus tombent en état de vie latente, ou meurent après avoir donné des spores. En général, plus un milieu est nutritif pour une espèce, plus elle y prospère, toutes les autres conditions étant égales. Il est très probable que, par addition de certaines substances en proportions minimes, on doit activer la multiplication, comme nous avons vu le zinc du *liquide Raulin* le faire pour l'*Aspergillus niger*; les recherches sur ce point sont à peine ébauchées.

La forme peut aussi varier dans certains cas suivant l'alimentation. Quand celle-ci est abondante, chez beaucoup d'espèces en bâtonnets, les articles tendent à rester unis en longues chaînes, ou se fusionnent en longs filaments. Nous avons vu que les *formes d'involution*, qu'on tient pour des productions de dégénérescence ou de sénescence, se produisent surtout quand les milieux nutritifs s'appauvrissent ou qu'il s'y rencontre des produits nuisibles.

La réaction du milieu a, ici, une grande importance. En général, les Bactéries ne se développent bien que dans des milieux neutres ou légèrement alcalins. Peu d'espèces aiment les milieux acides ; le *Bacillus aceti*, de la Mère de vinaigre, en est un rare exemple. Plusieurs des espèces qui provoquent la fermentation ammoniacale de l'urée peuvent vivre dans un milieu rendu fortement alcalin. Mais, en général, dès que la quantité d'acide ou d'alcali formé aux dépens du milieu par le microbe atteint un certain taux, la végétation s'arrête, sous l'influence nuisible de la réaction produite.

(1) Meade Bolton, Ueber das Verhalten verschiedener Bacterienarten im Trinkwasser (*Zeitschr. für Hygiene*, I, 1886, p. 76).

3. PRODUITS DE LA VIE CELLULAIRE

La vie microbienne s'accompagne toujours de la formation de produits divers provenant de l'activité propre du protoplasma. Le rôle, la nature, la composition de ces produits sont des plus variables ; leur influence est souvent très importante dans la biologie de l'espèce.

Certains de ces produits peuvent être regardés comme de véritables *sécrétions*, en se basant sur ce que l'on observe chez des êtres plus élevés; ils servent à l'utilisation directe des substances qui doivent entrer dans la nutrition. Les autres, semblant de véritables *excrétions*, sont plutôt des déchets de la vie cellulaire, destinés à être rejetés loin de la cellule à laquelle leur accumulation pourrait nuire. Il est encore difficile d'établir entre ces deux groupes des démarcations nettes, à cause de l'incertitude où l'on est du rôle véritable de certains de ces produits ; c'est pourquoi, bien qu'étant de destinée toute différente, leur étude ne peut guère être séparée jusqu'ici.

Diastases.

Les produits du premier groupe jouent un rôle considérable dans les phénomènes de nutrition des microbes. C'est en effet par leur intermédiaire que se produisent les modifications nécessitées d'ordinaire pour l'accomplissement de cet acte physiologique.

Les aliments peuvent se trouver dans le milieu sous une forme directement assimilable. C'est le cas le plus rare. Presque toujours il leur faut, pour pouvoir être absorbés, subir des modifications spéciales, qui portent simplement sur leur groupement moléculaire, ou des transformations plus profondes. Les uns sont solides et insolubles, l'amidon, la cellulose, l'albumine, la fibrine. D'autres, bien qu'en dissolution, ne peuvent servir à la nutrition qu'après un changement d'état : c'est ainsi que le sucre de canne a besoin d'être interverti, que les nitrates ont besoin d'être réduits. Ces transformations s'opèrent sous l'influence de sécrétions spéciales, de ferments solubles, auxquels on donne le nom général de *diastases* (1). Les conditions de nutrition des Bactéries sont, de ce côté, identiques à celles des êtres supérieurs.

L'action des diastases peut se résumer dans cette phrase magistrale de Duclaux: « Les diastases sont des moyens de dislocation et de destruction plus ou moins complète, et peut-être de construction des édifices moléculaires complexes élevés par la vie. »

Les substances à transformer se trouvant en très grand nombre, les diastases destinées à agir sur elles sont également très nombreuses. On peut les classer en plusieurs groupes en prenant comme base la nature même de la modification produite.

Beaucoup de ces diastases ont pour effet de dissocier une molécule complexe en plusieurs composés plus simples en y faisant pénétrer un certain nombre de molécules d'eau. On peut les nommer avec Duclaux *diastases d'hydratation*. D'autres, à l'inverse, provoquent la décomposition moléculaire avec élimination d'eau ; ce sont les *diastases*

(1) Duclaux, Chimie biologique, p. 120 et suiv.; Traité de microbiologie, t. II, 1899.

de déshydratation. Certaines agissent sur l'aliment par oxydation, *diastases d'oxydation*; d'autres par désoxydation, *diastases de réduction.*

Toujours se retrouve ce caractère primordial des diastases : la quantité de matière transformée est considérable par rapport à celle de substance diastasique, et, de plus, la modification accomplie, la diastase se retrouve là, prête à exercer à nouveau son action, si les circonstances s'y prêtent.

Les diastases produites par les Bactéries appartiennent à différents groupes dont voici les principaux :

1° Les diastases amylolytiques :
Amylase ;
Inversine ;
Sucrase ;
Cellulase.

2° Les diastases protéolytiques :
Présure ou coagulase ;
Pepsine ;
Trypsine ;
Caséase ;
Uréase.

3° Les diastases oxydantes :
Oxydases ;
Tyrosinase.

4° Les diastases réductrices :
Hydrogénases.

5° Les diastases cytolytiques :
Hémolysines ;
Leucocidines.

6° Les diastases lipolytiques :
Lipases.

Quelques exemples mettront mieux en relief le rôle et l'importance des diastases microbiennes.

L'amidon a besoin, pour être assimilé, d'être transformé en maltose et en glucose, d'être saccharifié. La plante qui redissout l'amidon emmagasiné dans ses réserves, l'embryon qui germe dans la graine, développent, à ce moment du besoin seulement, un ferment soluble, l'*amylase*, qui opère la modification ; l'animal, qui digère l'amidon, le fait avec son pancréas, qui sécrète de l'amylase. Beaucoup de Bactéries sécrètent une amylase identique. Hüppe (1) en a signalé la présence chez le *Bacillus lacticus*. Miller (2) a constaté qu'une Bactérie commune dans l'intestin de l'homme dissolvait promptement l'amidon. Wortman (3) a pu isoler, d'une culture de Bactéries de putréfaction de matières amylacées, un ferment soluble saccharifiant très promptement l'amidon. Vignal (4) a reconnu cette propriété à plusieurs des espèces

(1) Hüppe, Untersuchungen über die Zersetzung der Milch durch Microorganismen (*Mith. aus dem kaiserl. Gesundheitsamte*, II, p. 309, 1884).

(2) Miller, Ueber Gährungsvorgänge in Verdaungstractus und die dabei betheiligter Spaltpilze (*Deutsche med. Wochenschr.*, 1884, n° 40, p. 843).

(3) Wortman, *Zeitschr. für physiol. Chemie*, Bd. VI.

(4) Vignal, Recherches sur l'action des Microorganismes de la bouche sur quelques substances alimentaires (*Arch. de physiol.*, 1887, X, p. 286).

qui vivent en commensales dans la bouche de l'homme et auxquelles on doit très probablement rapporter l'action saccharifiante de la salive, en majeure partie sinon en totalité. Le *Bacille amylozyme* de Perdrix (1) transforme directement la fécule de pomme de terre en sucre qu'il fait alors fermenter en donnant de l'alcool éthylique et de l'alcool amylique. Le *Cladothrix chromogenes* attaque énergiquement l'amidon de la pomme de terre ; après quelque temps de culture, le tubercule peut être réduit à son squelette de cellulose.

L'amylase est très répandue chez les Bactéries, mais très inégalement distribuée. Fermi (2) la donne comme abondante chez les *Bacillus megaterium*, *B. subtilis*, *B. ramosus*, *B. Fitzianus*, chez le *Bacille du charbon*, le *Bacille de la tuberculose*, le *Spirille de Finckler et Prior* ; elle est peu abondante chez le *Bacille typhique*, le *Bacille de la diphtérie*, le *Bacille de la septicémie du lapin* ; il n'y en a pas traces chez le *Bacille pyocyanique*, le *Micrococcus prodigiosus*. D'après Eijkman (3), le ferment amylolytique serait très actif chez le *Bacillus anthracis*, le *Vibrio choleræ* et le *Vibrio Metschnikovi*.

Le sucre de canne et le sucre de lait ne peuvent servir directement aux échanges nutritifs des animaux et des plantes. L'animal les intervertit à l'aide de l'*inversine*, sécrétée dans son intestin. Les plantes qui ont du sucre cristallisable dans leurs réserves, la betterave, la canne à sucre, sécrètent, au moment où elles doivent l'utiliser, une diastase spéciale, la *sucrase*, qui le transforme en sucre interverti, mélange de glucose et de lévulose. C'est ce que fait la Levure de bière, lorsqu'on lui donne du sucre de canne comme aliment. C'est ce que doivent faire les nombreuses espèces de Bactéries pouvant vivre de sucre cristallisable. La présence de la sucrase a été signalée déjà chez le *Bacillus butyricus* et chez le *Bacillus lacticus* par Hüppe (4) ; Vignal (5) signale plusieurs Bactéries de la bouche, entre autres le *Bacillus subtilis*, qui intervertissent rapidement le sucre de canne.

Les microbes producteurs de ferment inversif sont peu nombreux ; sur soixante-deux espèces étudiées à ce point de vue, Fermi et Monterano (6) en signalent deux qui se montrent actives : le *Bacillus megaterium* et le *Bacille rouge de Kiel*.

Le *Bacillus butyricus* (7) et le *Spirillum rugula* (8), d'autres espèces (9),

(1) Perdrix, Sur les fermentations produites par un Microbe anaérobie de l'eau (*Ann. de l'Inst. Pasteur*, V, 1891, p. 287).

(2) Fermi, Contributo allo studio dei fermenti diastatici ed inversivi segregati dei microorganismi (*Annali d'igiene sperimentale*, II, 1892, p. 117). — Die saccharifizierende Wirkung des Bacillus tuberculosis (*Centralbl. für Bakt.*, Originale, XL, 1905, p. 187).

(3) Eijkman, Ueber Enzyme bei Bakterien und Schimmelpilze (*Centralbl. für Bakt.*, XXIX, 1901, p. 84).

(4) Hüppe, *loc. cit.*

(5) Vignal, *loc. cit.*

(6) Fermi et Monterano, Sull'inversione del saccharosio da parte dei microbi (*Annali d'igiene sperimentale*, IV, 1894, p. 383).

(7) Van Tieghem, Sur la fermentation de la cellulose (*C. R. de l'Acad. des sc.*, LXXXVIII, 1879, p. 205).

(8) Prazmowsky, Zur Entwickelungsgeschichte und Fermentwirkung einiger Bacterienarten (*Bot. Zeit.*, 1879, n° 26).

(9) Omeliansky, Ueber die Gärung der Cellulose (*Centralbl. für Bakt.*, 2te Abth., VIII, 1902, p. 193, 224, 257, 289, 321, 353, 385).

dont le *Bacillus asterosporus* (1), sécrètent une diastase, qui n'a pas encore été bien isolée, une *cellulase* ou *cellase* (2), qui dissout la cellulose et en permet l'absorption après l'avoir, au préalable, transformée en glucose ; il se dégage tantôt de l'hydrogène, tantôt du méthane, suivant l'espèce qui intervient. Ce ferment soluble n'agit pas sur toutes les variétés de cellulose ; c'est surtout les membranes végétales jeunes qu'il attaque. Celles qui se sont durcies par l'âge ou l'incrustation lui résistent ; il en est de même de la cellulose des plantes aquatiques. Il est très probable que ce sont de telles Bactéries qui jouent un rôle prédominant dans la digestion de la cellulose, celle qui se fait dans la panse des Ruminants, par exemple.

On doit rapprocher de la cellulase le ferment solubilisant la gélose, produit par une Bactérie que Gran (3) a isolée de l'eau de mer, le *Bacillus gelaticus.* Des Diatomées auraient la même action (4).

Les matières albuminoïdes, pour être absorbables, doivent subir une transformation plus complexe et moins connue. Elles deviennent solubles et se changent, en s'hydratant, en des produits dialysables, non coagulables par la chaleur, auxquels on donne les noms d'*albumoses* et de *peptones.* Ces phénomènes sont désignés sous le nom général de *protéolyse.* Un grand nombre de Bactéries possèdent la propriété de transformer ainsi les albumines et sont dites *protéolytiques.* D'après Fermi (5), la transformation qu'opéreraient les microbes seuls n'irait jamais jusqu'à la peptonisation. Cacace (6) dit cependant avoir nettement constaté la présence de petites quantités de peptones. Cette propriété existe, en particulier, très marquée chez les espèces occasionnant les putréfactions. La putréfaction, dans ce cas, débute toujours par une sorte de peptonisation ; avant la production des phénomènes putrides proprement dits, caractérisés surtout par l'apparition de gaz fétides, le milieu est très riche en albumoses dialysables, non coagulables par la chaleur, propeptones ou peptones, que l'on peut facilement retirer par l'ébullition et l'évaporation après filtration. Cette peptonisation s'accomplit, bien certainement, dans tous les cas, sous l'influence de diastases sécrétées par les Bactéries. Il est facile de constater la présence de peptones dans un liquide de culture au moyen de la *réaction du biuret.* En alcalinisant avec de la lessive de soude et ajoutant une solution très étendue de sulfate de cuivre. il se produit, lorsqu'il y a des peptones, une coloration rose ou violette.

La *liquéfaction de la gélatine*, phénomène d'une importance si grande dans la pratique des cultures, est causée par un ferment sécrété par l'espèce liquéfiante. Cette liquéfaction est en effet une véritable peptonisation, causée par une diastase très voisine de la pepsine, ou plutôt

(1) Ankersmitt. Untersuchungen über die Bakterien im Verdauungskanal des Rindes (*Centralbl. für Bakt.*, Originale, XXXIX et XL, 1905).

(2) Bertrand et Holderer, La cellase et le dédoublement diastasique du cellose (*C. R. de l'Acad. des sc.*, 1910, CXLIX. p. 1385, et CL, p. 230).

(3) Gran, Die Hydrolyse des Agars durch ein Enzyme (*Centralbl. für Bakt.*, 2te Abth., 1902, IX, p. 562).

(4) Richter, *Sitzungsb. der Wiener Acad.*, CXV, 1906.

(5) Fermi, I fermenti peptici e diastatici dei microbi (*Arch. für Hygiene*, XIV). — Fermi et Pampersi, Se i microorganismi peptonizino l'albumina (*Centralbl. für Bakt.*, 1te Abth., XX, 1896, p. 387).

(6) Cacace, Ueber das proteolytische Vermögen der Bakterien (*Ibid.*, 1901, XXX, p. 244).

agissant comme la papaïne en solution alcaline. Rietsch (1) a réussi à isoler le ferment dont il a reconnu la présence chez toutes les espèces, liquéfiant la gélatine, qu'il a examinées : il manquait au contraire chez les espèces ne liquéfiant pas, les *Bacillus typhosus* et *Bacillus tuberculosis* par exemple. Mavrojannis (2) avait conclu à l'existence de plusieurs ferments liquéfiant la gélatine, l'un la réduisant seulement au stade de gélatose, se solidifiant encore sous l'influence de l'aldéhyde formique ; un autre au moins la transformant complètement en gélatine-peptone, ne se solidifiant plus par ce réactif. Il semble bien que ce soit, chez toutes les espèces liquéfiantes, une seule et même diastase, pouvant agir d'une façon plus ou moins intense, s'arrêter même à une phase de début de l'action liquéfiante. La nature du milieu paraît avoir une grande influence sur la sécrétion du ferment et la production de la liquéfaction de la gélatine. L'addition de sucres diminue ou supprime cette liquéfaction (3) ; il en est de même de la présence de petites quantités de la plupart des antiseptiques.

Il est probable qu'il existe, dans ce groupe des *diastases protéolytiques*, plusieurs types de ferments sécrétés par les nombreux microbes qui s'attaquent aux matières albuminoïdes. On ne connaît pas sûrement d'espèce microbienne produisant de la *pepsine*, capable de digérer la fibrine en milieu acide. Les nombreuses espèces en question sécrètent de la *trypsine*, qui agit en milieu neutre ou alcalin. C'est la raison pour laquelle la décomposition de la matière albuminoïde dépasse toujours le terme de peptone, et donne des acides amidés, surtout de la leucine et de la tyrosine.

Dans ses études si complètes sur le lait, Duclaux (4) a obtenu de certaines Bactéries, agents de la fermentation de la caséine, les *Tyrothrix*, comme il les nomme, une diastase spéciale, la *caséase*, très voisine ou peut-être même identique à la trypsine. Cette *caséase*, mise en contact avec la caséine du lait, qui doit alors être coagulée par avance, la dissout ; il se forme un liquide opalescent des plus propre à l'assimilation.

La *caséase* n'agit que sur la caséine coagulée. Ce phénomène de précipitation peut se produire sous l'influence d'un autre ferment soluble, la *présure* ou *labferment* ou *coagulase*. Elle se trouve sécrétée, côte à côte avec la *caséase*, par les Bactéries de fermentation de la caséine. D'autres espèces la formeraient seule (5), mais c'est problématique. Le plus souvent, la coagulation se fait sous l'influence d'acides élaborés par le microbe aux dépens du milieu.

La peptonisation de la caséine et la liquéfaction de la gélatine marchent de pair chez les mêmes espèces. Les ferments protéolytiques microbiens semblent bien voisins, sinon identiques, constituant un produit diastasique d'un seul type, pouvant cependant présenter, dans des cas particuliers, des variétés d'action provenant sans doute uniquement des conditions de milieu.

(1) Rietsch, Ferments des Bactéries (*Journ. de pharm. et de chim.*, 1er juillet 1887).

(2) Mavrojannis, Sur la nature des diastases microbiennes liquéfiant la gélatine (*Soc. de Biol.*, LV, 1903). — Das Formol als Mittel zur Erforschung der Gelatineverflüssigung durch die Mikrobien (*Zeitschr. für Hygiene*, XLV, 1903, p. 108).

(3) Auerbach, Ueber die Ursache des Hemmung der Gelatineverflüssigung durch Bakterien durch Zuckerzusatz (*Arch. für Hygiene*, XXXI, 1897, p. 311).

(4) Duclaux, Le lait, Paris, 1887, J.-B. Baillière, et Chimie biologique, Paris, 1883.

(5) Savage, The coagulation of Milk by Bacillus coli communis (*Journ. of. Pathol. and Bacter.*, X, 1904, p. 90).

La transformation de l'urée en carbonate d'ammoniaque, causée par le *Micrococcus ureæ*, s'opère par l'intermédiaire d'une diastase isolée par Musculus (1), et dont la production par la Bactérie a été mise hors de doute par les recherches de Pasteur et Joubert (2). Miquel (3) a fait une étude soignée de cette *uréase*; il a montré qu'elle était sécrétée par un grand nombre d'espèces bactériennes qu'il réunit sous le nom de *ferments de l'urée*.

Des *diastases oxydantes*, des *oxydases*, se rencontrent assurément chez bien des espèces microbiennes. On doit certainement leur attribuer bien des changements de coloration des milieux de culture. Les brunissements ou noircissements des pommes de terre, des tubercules de dahlia, par exemple, que l'on observe en cultivant un certain nombre de Bactéries, paraissent dus à des oxydations de la tyrosine du milieu sous l'influence de ferments diastasiques oxydants (*tyrosinase* de Bourquelot) (4); il en est de même du verdissement de l'artichaut. Les *catalases* font peut-être partie de ce groupe (5). Loew (6) en signale chez le *Bacille pyocyanique*, Löwenstein (7) chez le *Bacille de la diphtérie*.

Certains microbes produisent aussi des *diastases réductrices*, telles que celle nommée *philothion* par Rey-Pailhade (8), qui provoque la formation d'hydrogène à l'état naissant, réduit à froid le carmin d'indigo et donne de l'hydrogène sulfuré avec la fleur de soufre. Ce sont de véritables ferments hydrogénants, des *hydrogénases* (9).

Les *diastases cytolytiques* ou *cytolysines* qui détruisent des éléments cellulaires, sont peut-être à rapprocher des diastases protéolytiques ou bien à regarder comme des toxines, alors des *cytotoxines*. Certains microbes produisent de l'*hémolysine* ayant la propriété de dissoudre les globules rouges. C'est, par exemple, le *Bacille du tétanos*, le *Bacille pyocyanique*, le *Bacille de la peste*, le *Bacille typhique*, le *Colibacille*, le *Bacille de la dysenterie*, le *Vibrion cholérique* et les *Vibrions cholérigènes*, le *Bacille du choléra des poules*, le *Pneumocoque*, le *Staphylocoque doré* et surtout le *Streptocoque pyogène*, parmi les pathogènes. Différentes espèces saprophytes en forment également, le *Bacillus megaterium* (10), le *Bacillus subtilis* (11) par exemple.

(1) Musculus, *C. R. de l'Acad. des sc.*, 1876.

(2) Pasteur et Joubert, Sur la fermentation de l'urine (*C. R. de l'Acad. des sc.*, LXXXIII, 1876).

(3) Miquel, Études sur la fermentation ammoniacale et sur les ferments de l'urée (*Ann. de micr.*, 1889-1899).

(4) Bourquelot, Sur la recherche de la tyrosine dans divers produits d'origine animale (*Soc. de Biol.*, 8 mai 1897). — Gessard, Études sur la tyrosinase (*Ann. de l'Inst. Pasteur*, XV, 1901, p. 593).

(5) Schmidt, Catalase, une nouvelle enzyme universellement répandue (*Bull. des sc. pharmacol.*, V, 1902, p. 57).

(6) Loew, Catalase, a new enzyme of general occurence (*U. S. Depart. of Agriculture Report*, n° 68, 1901).

(7) Löwenstein, Ueber Katalasen in Bakterienfiltraten (*Wiener klin. Wochenschr.*, 1903, n° 50).

(8) Rey-Pailhade, Recherches expérimentales sur le philothion. Paris, 1891. — Le philothion et le soufre (*Assoc. franç. pour l'av. des sc., Congrès de Besançon*, 1893).

(9) Pozzi-Escot, Contribution à l'étude des hydrogénases (*Bull. de la Soc. chimique de Paris*, XXVII, 1902).

(10) Vincent, Sur l'hémolysine du *Bacillus megaterium* (*Soc. de Biol.*, LXVII, 1909, p. 195).

(11) M. Nicolle, Action du *Bacillus subtilis* sur diverses Bactéries (*Ann. de l'Inst. Pasteur*, XXI, 1907, p. 613).

Le *Streptocoque pyogène* est l'espèce qui présente jusqu'ici les propriétés hémolytiques les plus marquées (1). Si l'on ajoute, à une culture qui commence bien à se développer, un peu de sang défibriné, emprunté à un animal quelconque ou à l'homme, on voit, au bout de quelque temps, les globules rouges se désagréger et finalement se dissoudre dans le liquide qui se teint d'une manière uniforme par diffusion de la matière colorante. Le même phénomène se passe dans les vaisseaux d'un animal mort d'infection streptococcique ; en prenant du sang dans le cœur ou dans un gros vaisseau, on obtient un liquide rouge, tout à fait transparent, où l'examen ne fait plus voir de globules rouges ; le sang est dit *laqué* ou, mieux, *hémolysé*. Le *Streptocoque pyogène* est le seul microbe qui produise l'hémolyse dans l'organisme lui-même. D'autres espèces produisent de l'hémolysine dans des cultures, mais très lentement, parfois après plusieurs semaines seulement, et, de plus, n'occasionnent l'hémolyse qu'*in vitro*, jamais *in vivo*; Ehrlich (2) et Madsen (3) signalent le fait pour le *Bacille du tétanos*, Bulloch et Hunter (4) pour le *Bacille pyocyanique*, Neisser et Wechsberg pour le *Staphylocoque doré*, Lévy pour le *Bacille typhique*.

L'hémolysine n'est pas spéciale aux Bactéries. Kobert l'a signalée en 1890 dans l'*Amanita phalloides*, comme le véritable principe actif de ce Champignon si redoutable.

Il est de ces cytolysines qui ont une action dissolvante sur les Bactéries elles-mêmes, qu'elles détruisent par *bactériolyse*. Telles la *pyocyanase* que produit le *Bacille pyocyanique*, dissolvant certains microbes, le *Bacille diphtérique* entre autres. Tel aussi le ferment des cultures du *Bacillus subtilis* qui, d'après Nicolle, dissout facilement le *Pneumocoque*, le *Bacille typhique*, le *Bacille de la peste*, le *Bacille du charbon*, le *Vibrion cholérique*.

Les *leucocidines*, très peu connues, altèrent rapidement les globules blancs ; sous leur influence, leur protoplasma s'éclaircit, puis se dissout ; le noyau peut même être attaqué. Le *Staphylocoque doré* et le *Bacille pyocyanique* produisent des leucocidines dont l'action est bien manifeste dans les exsudats leucocytaires que détermine leur injection dans les séreuses.

Les graisses peuvent être décomposées par des espèces qui produisent des *diastases lipolytiques*, des *lipases*, les dédoublant, par hydrolyse, en acides gras et en glycérine. Parmi les Bactéries productrices de lipases, il faut citer le *Bacille pyocyanique*, le *Staphylocoque doré*, le *Bacillus prodigiosus* et le *Bacillus fluorescens liquefaciens*.

Toutes ces substances diastasiques sont sensibles à la chaleur. Elles sont *thermolabiles* ; en solution, elles perdent leur action spéciale à des températures variant entre 55° et 80°, suivant les conditions de

(1) Besredka, De l'hémolysine streptococcique (*Ann. de l'Inst. Pasteur*, XV, 1901, p. 880).

(2) Ehrlich et Morgenroth, Ueber Haemolysine (*Berl. klin. Wochenschr.*, 1899, n° 22 ; 1900, n° 21).

(3) Madsen, Ueber Tetanolysine (*Zeitschr. für Hygiene*, XXXII, 1899).

(4) Bulloch et Hunter, Ueber Pyocyanolysin, eine haemolytische Substanz in Kulturen der Bacterium pyocyaneum (*Centralbl. für Bakt.*, XXVIII, 1900, p. 865).

milieu. Desséchées, au contraire, elles peuvent supporter facilement le chauffage à 100° et même des températures supérieures.

Toxines.

Au voisinage des diastases vraies dont il vient d'être question, doivent se placer dés substances de composition similaire, produites comme elles par le protoplasma actif de certaines espèces microbiennes, qui jouent un rôle très important dans l'action physiologique propre à ces espèces.

Par leur constitution et leurs propriétés générales, ces substances ont été rapprochées des matières albuminoïdes. On les a dénommées, un peu au hasard, *albumines toxiques*, *albumoses toxiques*, *toxalbumines*, ou, plus simplement, *toxines*, à cause de leur action éminemment toxique. C'est cette dernière dénomination qui paraît prévaloir d'une façon générale, quoique beaucoup moins précise ; nous verrons qu'elle est appliquée couramment aux solutions des vrais produits toxiques dans les milieux propices au développement du microbe qui les produit ; il est nécessaire de bien faire cette distinction.

On a réparti ces toxines en deux groupes. Les *toxoprotéines* ont sur l'organisme un effet toxique rapide, souvent immédiat; elles ne sont mises en liberté que par destruction de l'élément qui les produit. La substance toxique du *Bacille de la peste* serait une toxoprotéine, comme les toxines des venins animaux. Les *toxalbumines* n'agissent qu'après une véritable période d'incubation, variable pour chacune d'elles ; elles constituent un véritable produit de sécrétion des éléments microbiens ; les substances toxiques du *Bacille du tétanos*, du *Bacille de la diphtérie*, entre autres, appartiennent à ce dernier groupe.

Dans les toxines de ce dernier groupe, des distinctions sont à faire. Les unes sont très diffusibles : sortant des corps microbiens, elles peuvent aller au loin déterminer des lésions graves ; c'est le cas, par exemple, de la toxine diphtérique et de la toxine tétanique. D'autres sont très adhérentes au corps des microbes ; elles agissent surtout sur place où les microbes les abandonnent lentement au milieu ambiant, soit pendant la vie, soit par leur désagrégation après la mort. On dénomme ces dernières *endotoxines* (1) ; les endotoxines typhique, pesteuse, dysentérique en sont des exemples. Une espèce peut, du reste, produire plusieurs toxines, des toxines diffusibles et des endotoxines. Le *Bacille de la tuberculose* peut déterminer des troubles généraux par ses toxines solubles diffusant au loin, et des lésions locales, de caséification ou de sclérose, par ses poisons adhérents.

Ces substances possèdent beaucoup des propriétés des diastases, en particulier sont insolubles dans l'alcool, adhèrent facilement aux précipités qui se produisent dans les liquides où elles se trouvent en dissolution. Elles sont souvent sensibles à l'action de la chaleur et de la lumière ; beaucoup se détruisent de 60° à 70° et à la lumière en présence de l'air. A l'état sec, elles supportent des températures bien supérieures, 120° et plus. Certaines supportent facilement 100° en solution, la tuberculine et la malléine par exemple. Introduites dans l'organisme animal,

(1) Besredka, Des endotoxines solubles (*Ann. de l'Inst. Pasteur*, XX, 1906, p. 304).

elles visent de préférence ou uniquement certains éléments où elles se fixent et dont elles modifient le fonctionnement dans un sens déterminé. Comme les diastases encore, elles peuvent exercer des actions considérables à des doses infinitésimales. Toutefois, comme le fait remarquer si judicieusement Duclaux (1), elles ont cette particularité que, au lieu d'agir sur une substance inerte, l'aliment à modifier, comme les diastases véritables, elles agissent sur une substance contenue dans des cellules vivantes, modifiant plus ou moins, dans un sens ou dans un autre, les propriétés biologiques de ces éléments.

Telles qu'on les connaît actuellement, ces toxines paraissent être des corps amorphes, d'un blanc jaunâtre, sans odeur, solubles dans l'eau, la glycérine, l'alcool faible, insolubles dans l'alcool fort et la plupart des autres dissolvants ordinaires. Mises en solution dans l'eau, elles sont facilement entraînées par les précipités gélatineux, comme les diastases. Elles sont précipitables par l'alcool, l'acétate de plomb, l'azotate d'argent, l'iodure double de potassium et de mercure. Elles donnent la réaction du biuret et se colorent comme les albuminoïdes avec le réactif de Millon.

Il est fort probable qu'on doit les rapporter aux sécrétions vraies et les éloigner des produits d'excrétion. Elles servent en effet directement à la vie microbienne, en favorisant l'action et la pullulation du microbe aux dépens des organismes qu'il attaque et envahit; elles font corps avec son action physiologique et sont, par là, plus ou moins nécessaires à sa vie. Les recherches d'Ouchinsky démontrent que la toxine diphtérique peut se former dans des milieux absolument privés d'albumine élaborée complètement par le protoplasma microbien.

Leur action physiologique, très variable suivant l'espèce, sera exposée à l'étude des Bactéries pathogènes. Physiologiquement, elles se trouvent caractérisées par certaines propriétés spéciales. Elles ont d'ordinaire une très grande toxicité; des effets d'une grande intensité sont déterminés par des quantités extrêmement minimes. Beaucoup présentent la particularité d'exiger un temps d'incubation, comme les microbes vivants. Elles présentent une réelle spécificité d'action et leur action a des rapports étroits avec celle du microbe producteur. Enfin toutes les toxines ont la propriété de provoquer, dans les organismes qu'elles influencent, la production d'anticorps, spécifiques également, les *antitoxines*, dont il sera question plus loin.

Les effets toxiques que produisent ces toxines sont cependant toujours moindres que ceux que détermine le microbe vivant. Certaines ont une action rapide, foudroyante, qui rappelle beaucoup celle du venin des serpents, dont les principes actifs se rangent dans la même catégorie. La toxine diphtérique rappelle par ses réactions le principe toxique qui a été isolé du sang des Murénides par Mosso.

C'est Roux et Yersin (2), dans leurs belles recherches sur la diphtérie, qui ont les premiers signalé, dans les cultures du Bacille spécifique de cette affection, un corps « ayant beaucoup d'analogies avec les diastases », précipitable comme elles par l'alcool, pouvant être entraîné comme elles par certains précipités gélatineux, comme celui de phosphate de chaux, produits dans le liquide qui les contient.

(1) Duclaux, Traité de microbiologie, II, p. 18.
(2) Roux et Yersin, Mémoires sur la diphtérie (*Ann. de l'Inst. Pasteur*, 1888 et 1889).

Christmas (1), peu après, a isolé de cultures d'une Bactérie de la suppuration, le *Micrococcus pyogenes aureus*, une substance similaire, ayant des propriétés pyogènes manifestes.

Après eux, Hankin (2) découvrait dans les cultures pures de *Bacille du charbon* une matière albuminoïde spéciale, une *albumose*, possédant une puissance toxique extrêmement énergique. Ce principe existe surtout abondamment dans les vieilles cultures dans le bouillon. Il l'isole en précipitant par l'alcool et dialysant ; le résidu est dissous dans l'eau distillée et filtré sur une bougie Chamberland. Cette substance, injectée dans les veines du lapin, à la faible dose d'un dix-millionième du poids du corps, rendrait les animaux réfractaires aux inoculations les plus virulentes.

Les recherches les plus complètes jusqu'ici sur ces matières albuminoïdes toxiques ont été faites par Brieger et Fraenkel (3). Ils ont d'abord étudié celle découverte par Roux et Yersin dans les cultures de *Bacille de la diphtérie*. Ils l'obtiennent en précipitant les bouillons de cultures filtrés sur une bougie Chamberland, par le sulfate d'ammoniaque, à une température de 30°. Le sel que peut contenir le précipité est éliminé par la dialyse, jusqu'à disparition de précipité par le chlorure de baryum. On dessèche le résidu dans le vide, à 40°. On obtient alors une substance amorphe, floconneuse, très légère, d'un blanc éclatant, qui possède beaucoup des réactions des albumines solubles. Elle est extrêmement soluble dans l'eau, ne précipite pas par l'ébullition, par l'acétate de plomb, par l'acide nitrique étendu même à chaud ; précipite, au contraire, par l'acide carbonique en solution chargée, par les acides minéraux concentrés, l'acide acétique, l'acide phénique, le sulfate de cuivre, le nitrate d'argent, le bichlorure de mercure. Elle ne donne aucun résultat positif avec les réactifs des alcaloïdes ; par contre, elle donne d'une façon très nette la réaction du biuret, celle de la xanthoprotéine et la coloration rouge avec le réactif de Millon, caractéristique des matières albuminoïdes typiques, ce qui permet d'affirmer que c'est un dérivé de l'albumine. Les auteurs ont même pu déterminer sa composition centésimale, qui se rapproche beaucoup de celle de la sérine.

Toutefois, cette substance présente une toxicité bien moindre que celle que Roux et Yersin avaient isolée dans les mêmes conditions. Tandis que ces derniers tuaient un cobaye par l'inoculation sous la peau de deux dixièmes de milligramme de leur produit toxique, les auteurs allemands doivent, pour arriver au même résultat, inoculer 10 milligrammes du leur. Ce qui semble démontrer qu'ils n'obtiennent par leur procédé qu'un mélange complexe, ne contenant qu'une assez faible proportion de matière réellement toxique.

Malgré tout, la nature vraie des toxines est encore très peu connue. Elle peut être fort complexe ; pour Gautier (4), elles se composeraient

(1) Christsmas, Recherches expérimentales sur la suppuration (*Ann. de l'Inst. Pasteur*, 1888, p. 470).

(2) Hankin, Immunity produced by Albumose isolated from Anthrax cultures (*Brit. med. Journ.*, 1889, p. 810).

(3) Brieger et Fraenkel, Untersuchungen über Bacteriengifte (*Berl. klin. Wochenschr.*, 1890, nos 11 et 12). — Brieger, Weitere Erfahrungen über Bakteriengifte (*Zeitschr. für Hygiene*, XIX, 1895, p. 101).

(4) Gautier, Les toxines, p. 309.

de mélanges de produits alcaloïdiques et de produits azotés voisins des matières albuminoïdes, nucléines, nucléo-albumines.

On peut même penser que les toxines vraies ne sont pas de nature albuminoïde, mais sont des produits de nature colloïdale imprégnant seulement des substrats albuminoïdes divers, globulines, sérines, peptones, protéines, avec lesquels on les confond. Ce qui vient appuyer une telle opinion, c'est que les mêmes substances et les mêmes actions qui précipitent des solutions colloïdales montrent dans une mesure égale une action destructive sur les toxines.

Les Bactéries ne sont pas du reste les seuls êtres qui puissent produire de telles substances ; Ehrlich (1) a montré que l'*abrine* du jéquirity et la *ricine* des graines de ricin avaient de très étroites relations avec les toxines du tétanos et de la diphtérie, ce qui tendrait à faire penser que la fonction d'élaborer de tels produits est une propriété biologique des éléments vivants.

Ptomaïnes.

C'est parmi les produits de déchet qu'on doit ranger les *ptomaïnes*. Ce sont des composés tout autres que les précédents ; véritables bases azotées, elles sont voisines des alcaloïdes végétaux, dont elles se rapprochent beaucoup par leurs réactions chimiques et leur action physiologique. Elles ont été signalées dans les décompositions de matières animales et désignées sous le nom de *ptomaïnes* (πτῶμα, cadavre). Selmi (2) les a obtenues le premier des cadavres humains. Gautier (3) en a donné en même temps une étude chimique bien plus complète et a précisé leurs rapports avec la putréfaction et, conséquemment, le développement des Bactéries. On en a obtenu depuis un grand nombre dont l'étude se trouve surtout dans les mémoires de Brieger (4) et de Gautier.

Les unes sont sans action sur l'organisme animal ou n'ont que des effets physiologiques peu marqués et passagers. D'autres déterminent des troubles plus ou moins prononcés, souvent considérables, amenant rapidement la mort, à doses très faibles ; elles sont en tout comparables aux poisons végétaux les plus énergiques, surtout la morphine, l'atropine, la muscarine des champignons vénéneux. Les troubles occasionnés par des ptomaïnes, produites par des Bactéries pathogènes, peuvent ressembler à quelques-uns de ceux que l'on observe dans les maladies infectieuses où elles se rencontrent. Bouchard (5) a retiré des urines, dans des cas de maladies infectieuses, des quantités notables de ptomaïnes qui proviennent, pour lui, du développement dans l'organisme des Bactéries pathogènes, cause de l'affection. Griffiths (6) a

(1) Ehrlich, *Deutsche med. Wochenschr.*, 1891.

(2) Selmi, *Actes de l'Acad. de Bologne*, 1872 et suiv.

(3) Armand Gautier, Traité de chimie appliquée à la physiologie. Paris, 1884. — Gautier et Étard, *C. R. de l'Acad. des sc.*, XCIV, p. 1600, et XCVII, p. 266. — Gautier, Les toxines microbiennes et animales, 1896.

(4) Brieger, Microbes, ptomaïnes et maladies, traduction par Roussy et Winter. Paris, 1887.

(5) Bouchard. Sur la présence d'alcaloïdes dans les urines au cours de certaines maladies infectieuses (*Soc. de Biol.*, août 1882).

(6) Griffiths, *C. R. de l'Acad. des sc.*, CXV, p. 185, 418 et 667 ; CXVI, p. 1206 ; CXIII, p. 656 ; CXIV, p. 496 et 1383 ; CXVII, p. 744 ; CXX, p. 1228.

étendu ces recherches à toute une série d'affections et a pu, dans certains cas, obtenir des ptomaïnes à l'aide desquelles on pouvait reproduire chez l'animal une partie des symptômes de l'affection première.

Il serait d'un très haut intérêt de pouvoir rapporter à des espèces de Bactéries bien définies une ptomaïne donnée. On a eu effectivement affaire, dans ces expériences, à des espèces diverses qui, se développant côte à côte, mélangeaient leurs produits d'excrétion. En opérant sur des cultures pures, il doit être possible d'arriver à une précision plus grande. Brieger l'a fait pour quelques espèces. Un très intéressant essai a été fait par Tito Carbone (1) avec des cultures de *Proteus vulgaris*, Bactérie très commune dans les putréfactions animales. De grandes quantités de viande stérilisée, finement hachée, étaient ensemencées à l'aide de cultures pures de l'espèce en question; lorsque le développement se faisait au mieux, que la putréfaction était avancée, l'auteur procédait à l'analyse. Il a ainsi reconnu la présence, dans ces cultures où ne végétait que la seule espèce en question, de différentes bases trouvées dans les putréfactions de chair de poisson, en particulier la choline, l'éthylène diamine, la gadinine et la triméthylamine. Leur nature, du reste, varie probablement suivant la composition du milieu que le microbe décompose.

Gaertner (2), déjà, avait signalé la présence de ptomaïnes toxiques dans les cultures pures du *Bacillus enteritidis*, rencontré dans la viande altérée ayant occasionné une intoxication putride.

C'est peut-être, d'après cela, à la formation de ptomaïnes, par suite de leur envahissement par des Bactéries, parmi lesquelles on trouve toujours l'espèce *Proteus vulgaris*, que nous venons de citer, qu'il faut attribuer quelques-uns des empoisonnements causés par les viandes putréfiées. Cependant, en général, les ptomaïnes paraissent être moins toxiques que les toxines et jouer un rôle bien moindre dans les diverses actions bactériennes; elles doivent tout à fait être reléguées au second plan.

Pour Gautier (3), ces poisons alcaloïdiques proviendraient des toxalbumines par action fermentative du microbe.

Si ces résultats peuvent servir à expliquer, en tout ou en partie, l'action nuisible de certaines espèces, il n'en est pas de même pour d'autres. Des Bactéries pathogènes pour l'homme ou les animaux, étudiées à ce point de vue, n'ont encore rien fourni. Nous reviendrons plus loin sur ces sujets importants, en parlant de l'action des Bactéries pathogènes sur l'organisme.

Produits divers.

A côté de ces produits de sécrétion qui servent directement à la nutrition et à certaines fonctions vitales du microbe, il en existe d'autres qui semblent ne plus pouvoir servir aux fonctions vitales, mais au

(1) Tito Carbone, Ueber die von Proteus vulgaris erzeugten Gifte (*Centralbl. für Bakt.*, 1890).

(2) Gaertner, Ueber die Fleischvergiftung in Frankenhausen und den Erreger derselben. Iéna, 1888.

(3) Gautier, Les toxines, p. 530.

contraire, véritables substances de déchet, entraver ou empêcher le développement, s'ils s'amassent en quantité un peu grande dans le milieu. Ces produits peuvent provenir directement du protoplasma vivant lui-même ou des substances transformées pour la nutrition. Qu'ils nuisent au développement en exerçant une action toxique sur les cellules vivantes ou en gênant l'élimination des substances que chaque élément produit continuellement, ils doivent être mis en état de ne pas nuire, sans quoi les fonctions des éléments cessent de s'accomplir, la mort s'ensuit bientôt. Ils sont donc, par leur nature et leurs effets, en tout comparables aux produits d'excrétion des êtres supérieurs. C'est ainsi, par exemple, que les fermentations lactique ou butyrique s'arrêtent bientôt, si l'on ne prend pas soin de neutraliser l'acide avec de la chaux.

Parmi les substances de déchet qui résultent de l'activité vitale de ces microbes, on rencontre en outre un grand nombre de produits intéressants. Les uns sont fixes, les autres volatils ; certains contribuent à donner aux espèces qui les produisent des caractères importants.

Les produits fixes sont surtout formés d'acides organiques, acides lactique, acétique, formique, d'aldéhyde, de composés amidés, et au premier rang on trouve toujours la leucine, la tyrosine, le glycocolle.

Les produits volatils sont d'abord des gaz (1), hydrogène, acide carbonique, carbures d'hydrogène, hydrogène sulfuré (2) et même hydrogène phosphoré ; puis des acides gras, acide butyrique, acide valérianique, entre autres ; enfin, des ammoniaques composées, des mercaptans, mercaptan de méthyle surtout, peut-être du mercaptan d'allyle, du phénol (3), de l'indol (4), du scatol. Ce sont certains de ces corps, ou le mélange de plusieurs, qui forment l'odeur, parfois bien particulière, que développent beaucoup de Bactéries.

La présence de quelques-uns de ces produits peut fournir des renseignements utiles à connaître ; les meilleurs moyens à employer et les déductions à tirer seront exposés plus loin (Voy. *Procédés d'étude des produits formés dans les cultures*).

4. REPRODUCTION

D'ordinaire, lorsqu'une espèce trouve, dans le milieu où elle vit, les éléments nécessaires à son existence, elle se multiplie *par division*. Lorsque, au contraire, le milieu lui est défavorable, s'il ne renferme qu'une trop faible proportion de matières nutritives ou si elle se l'est elle-même rendu nuisible par suite de l'accumulation de ses produits de désassimilation, elle forme des *spores*. La présence de conditions mauvaises n'est cependant pas toujours la cause de formation de spores. Beaucoup d'espèces en forment en pleine période de végétation,

(1) Pammel, A contribution on the gases produced by certain bacteria (*Centralbl. für Bakt.*, 2te Abth., II, p. 633).

(2) Petri et Maassen, *Arb. aus dem kaiserl. Gesundheitsamte*, VIII, 1892-1893, p. 318 et 490.

(3) Lewandowski, Ueber Indol und Phenolbildung durch Bakterien (*Deutsche med. Wochenschr.*, 1890, n° 51).

(4) Morris, Studien über die Production von Schwefelwasserstoff, Indol und Merkaptan bei Bakterien (*Arch. für Hygiene*, XXX, 1897, p. 304).

tantôt constamment, tantôt seulement dans des conditions déterminées. C'est ainsi que le *Bacillus anthracis*, ensemencé dans du bouillon frais, donne, au bout de très peu de temps, de nombreuses spores dans les bâtonnets associés en longs filaments ; lorsqu'il se multiplie dans l'organisme animal, par contre, il le fait uniquement par division. Le *Bacillus subtilis* donne très facilement des spores dans tous les milieux où il peut végéter.

Multiplication par division. — C'est de beaucoup le mode le plus commun d'extension de l'espèce ; c'est peut-être le caractère le plus général qu'on puisse reconnaître aux êtres qui nous occupent, celui qui les a fait nommer *Schizomycètes*, *Schizophytes*. A proprement dire, ce n'est pas une reproduction véritable. Le phénomène de reproduction implique en effet l'idée de formation d'individus nouveaux ; dans la division vraie, un élément, préparé par divers changements qui se sont opérés en lui, en forme deux ou plusieurs, sans qu'aucun caractère ne puisse faire distinguer un élément producteur d'un élément produit. Il y a là un fait tout à fait comparable au bouturage et au marcottage des plantes supérieures. Ce sont des actes purement végétatifs, dans lesquels on ne peut voir une formation réelle de nouveaux êtres, mais simplement l'extension d'un même individu dans le temps et dans l'espace ; de telles cellules, issues de la division successive d'un même élément, ne représentent, à vrai dire, qu'un corps à éléments dissociés et non pas un ensemble d'individus.

Il est facile d'observer la division de la cellule chez certaines Bactéries en bâtonnets de grande taille. Il suffit d'en placer dans une goutte de liquide nutritif, de recouvrir d'une lamelle et de luter la préparation pour empêcher l'évaporation. Chez les espèces qui n'ont pas un grand besoin d'air pour croître, le développement peut s'observer ainsi pendant un temps assez long. Chez les Bactéries très avides d'oxygène, il faut recourir à d'autres procédés ; l'emploi des *chambres humides*, qui seront décrites plus loin, répond parfaitement au but que l'on se propose.

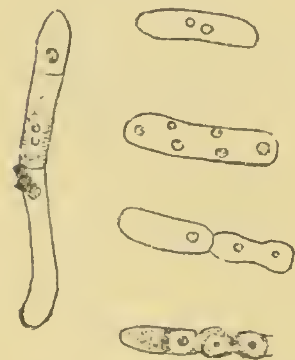


Fig. 27. — Bactéries du tartre dentaire du chien, 1200/1.

La division des bâtonnets semble toujours se faire transversalement ; les rares faits de division longitudinale rapportés ne sont probablement que des apparences.

Lorsqu'une cellule est arrivée à une longueur qui semble fixe pour l'espèce dans des conditions qu'on peut admettre comme normales, il apparaît en son milieu une cloison très mince, hyaline, qui la divise en deux parties égales. Les phénomènes de la division de la masse protoplasmique ne sont pas connus, pas plus que le mode de formation de la cloison nouvelle, qui apparaît probablement au même moment dans toute son étendue, sécrétée par les deux portions du protoplasma qui ont dû subir une scission préalable. Si l'on considère comme de véritables noyaux les sphères réfringentes signalées plus haut (p. 26), la présence fréquente de deux de ces sphères (fig. 27) dans le milieu de bâtonnets qui ont atteint une longueur suffisante pour se diviser, conduirait à généraliser plus encore le rôle important que joue le noyau dans la division cellulaire. Quoi qu'il en soit, la cloison s'accentue,

gagne en épaisseur; sa partie moyenne se gélifie et écarte l'un de l'autre les deux individus résultant de la division du bâtonnet primitif. La figure 28, schématique, montre les différents stades du phénomène. Dans certains cas, la séparation est très nette, la partie moyenne gélifiée existe réellement. Souvent, au contraire, l'espace clair intermédiaire est une pure illusion d'optique; les deux cylindres restent parfaitement juxtaposés; il est facile de s'en convaincre en rapprochant un peu l'objectif de la préparation. Cette dernière disposition se rencontre surtout lorsque les bâtonnets restent accolés bout à bout en grand nombre. La couche médiane gélifiée est plus ou moins diffluente; elle peut se dissocier entièrement; les deux cellules se séparent alors complètement. Lorsque les bâtonnets restent unis, il se forme des filaments de longueur d'autant plus grande qu'ils renferment plus d'articles. Les filaments sont droits ou brisés en des points de séparation des articles. Ils sont fréquemment courbés et parfois pelotonnés de façon à produire des spirales enchevêtrées les unes dans les autres, de véritables tresses. C'est pour des formes de cette dernière sorte qu'a été créée la dénomination de *Spirulines*, qu'on a rapprochées à tort des vraies formes spiralées, des *Spirillum*. A preuve que cette disposition est purement accidentelle et secondaire, c'est qu'on rencontre tous les intermédiaires possibles entre les filaments à peine courbés et les amas de filaments irrégulièrement hélicoïdaux.

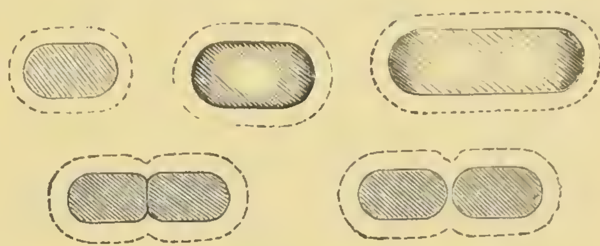


Fig. 28. — Schéma de la division des bâtonnets.

Il arrive parfois que la cloison de séparation de bâtonnets est si mince et si transparente qu'il devient presque impossible de l'apercevoir; on prend alors la chaîne pour un long filament simple. Il faut contracter le protoplasma des différentes cellules à l'aide de réactifs ou colorer la membrane avec une teinture, pour faire nettement apparaître la division.

D'après Schaudinn (1), chez le *Bacillus Butschlii* la division s'opère de la façon suivante. Dans un bâtonnet qui va se diviser, il apparaît, au milieu du cytoplasme de la partie médiane, une grosse granulation d'aspect fortement réfringent. Cette granulation s'élargit en une sorte de disque perpendiculaire à l'axe de la cellule, s'étalant jusqu'à atteindre la membrane à laquelle il se soude. Au milieu du disque apparaît un espace clair qui s'élargit peu à peu; la substance cellulaire s'y raréfie, se fond dans le liquide ambiant ainsi que la partie correspondante de la membrane; les deux éléments issus de la division sont libres (fig. 35, p. 76; *2*, *3*, *4*, *5*, *6* et *7*).

Au lieu de rester unis les uns au bout des autres en filaments, certains Bacilles se séparent, puis s'accolent latéralement, de manière à former des séries transversales parfois très longues. Vus de champ, de tels amas semblent, suivant le nombre des rangées, des chaînes ou des piles de *Micrococcus*. Chez le *Bacillus butyricus*, l'agent si répandu de la décomposition de la cellulose et de la fermentation butyrique de bien des matières ternaires, le bâtonnet prêt à se diviser devient

(1) Schaudinn, Beitrag zur Kenntniss der Bakterien und verwandter Organismen (*Arch. für Protistenkunde*, I, 1902, p. 306).

immobile, puis se segmente en deux nouveaux éléments qui se séparent et s'accolent intimement suivant leur longueur, en glissant l'un sur l'autre. Le phénomène se répétant un grand nombre de fois, il se forme des rangées droites, plus ou moins courbées ou disposées en zigzags, de bâtonnets réunis entre eux par de la substance mucilagineuse.

Chez les Bactéries sphériques, les choses se passent d'une manière analogue. L'élément rond s'allonge et devient ellipsoïdal ; il peut, à ce moment, avoir la forme d'un court cylindre à extrémités arrondies (fig. 29, *1*, *2*). Il se produit dans la région médiane un étranglement (fig. 29, *3*) ; c'est l'aspect décrit sous le nom de *biscuit à la cuiller* ou de *forme en haltère*. L'étranglement se prononçant de plus en plus, il en résulte la formation de deux coccus, semblables au premier (fig. 29, *4*). Les rapports qu'affectent entre eux les éléments issus de la division sont tout aussi variables que chez les Bacilles. Les coccus peuvent se séparer lors de la division et vivre isolés dans le liquide. On les trouve souvent unis deux à deux ; on nomme cette forme *Diplococcus* (διπλοος, double). Ou bien ils restent unis à plusieurs en séries linéaires droites ou flexueuses ; c'est la disposition désignée sous le nom de *Torula* (*torulus*, renflé en nœuds) ou de *Streptococcus* (στρεπτὸς, tourné). Le nom de *Staphylococcus* (σταφυλὴ, raisin) a été appliqué à des formes où les éléments, séparés dès la division, sont réunis, plus tard, en amas irréguliers qui ont été comparés, d'une façon assez peu heureuse, à des grappes de raisin.

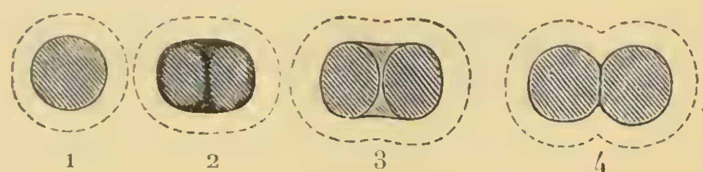


Fig. 29. — Schéma de la division chez les Micrococcus.

On a voulu faire, de ces différences de situation des éléments, des signes de première importance et les élever au rang de caractères génériques. Les genres *Diplococcus*, *Streptococcus* et *Staphylococcus* ne peuvent guère être maintenus, comme coupes de l'ancien genre *Micrococcus*, si l'on remarque que les caractères sur lesquels on se base pour les établir varient dans des limites fort larges, et que souvent les variations dépendent exclusivement des conditions de milieu. La forme seule en *Diplococcus* semble plus constante et plus fixe, surtout pour les espèces où les deux éléments accolés sont devenus asymétriques, par suite de l'aplatissement de leur face médiane. De plus, lorsque ces *Diplococcus* s'unissent en chaînes, l'arrangement par couples persiste, très évident ; l'espace qui sépare deux couples de la chaîne est notablement plus grand que celui qui sépare deux éléments d'un même couple (fig. 30). Ces dénominations de *Diplocoques*, *Streptocoques* et *Staphylocoques* sont cependant très utiles à conserver ; elles peuvent fournir des points de repère importants et faciles à constater pour la diagnose des espèces.

La division ne semble pas toujours se faire d'une façon aussi régulière, aussi typique, chez les *Micrococcus*. Dans bien des cas, les deux éléments provenant d'un même acte de multiplication ne sont pas égaux. L'un d'eux est toujours sensiblement plus petit que l'autre ; dans les *Diplocoques*, c'est toujours le plus rapproché du centre du couple primitif (fig. 31). Il y a là un lien évident avec le mode de multiplication

par bourgeonnement, si fréquent chez les Levures. La couche externe gélifiée de la membrane peut se séparer lors de la division, elle montre alors un étranglement bien net au niveau de la séparation des éléments, ou persiste comme une gaine unie autour de deux ou plusieurs cellules qui se touchent alors par une face.



Fig. 30. — Diplococcus asymétriques.

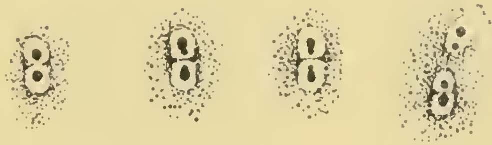


Fig. 31. — Diplocoques de la pneumonie.

Au lieu de se faire dans une seule direction, comme dans les cas précédents, la division peut s'opérer dans plusieurs directions à la fois, soit simultanément, soit plutôt successivement.

Une cellule de *Micrococcus tetragenus* se divise suivant deux plans perpendiculaires ; il se forme ainsi une *tétrade* (fig. 32), dont les éléments se comportent comme celui qui leur a donné naissance, et constituent, après avoir proliféré un certain nombre de fois, de petites tablettes aplaties, des *lames*.

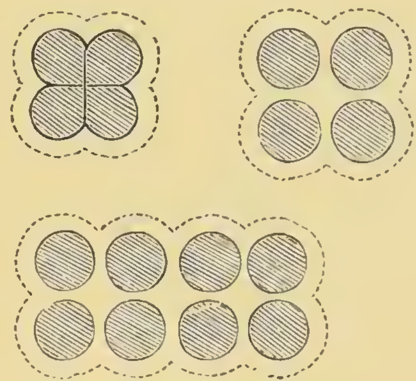


Fig. 32. — Schéma de la production de tétrades.

Chez les *Sarcines*, le phénomène est encore plus compliqué. Une des cellules arrondies s'agrandit et se divise suivant trois directions, par trois plans perpendiculaires. Le résultat est un petit cube de huit éléments, qui se diviseront ensuite comme la sphère primitive. Lorsque le phénomène se sera répété, il aura produit une masse cubique plus ou moins volumineuse, formée de nombreux cubes plus petits, de petits paquets de huit éléments chacun (fig. 33).

Le mode de formation de ces tétrades et de ces masses cubiques n'est pas encore exactement connu. J'ai reconnu chez la *Sarcina lutea*, espèce très commune dans l'air et dans l'eau, que la division se passait de la façon suivante : une cellule, prête à se diviser, s'allonge transversalement et se partage en deux parties égales, formant ainsi un diplocoque, comme le représente la figure 29. Chacun des deux éléments produits est le siège du même phénomène ; on obtient une tétrade. Mais la direction de l'allongement de ces deux éléments, et par conséquent la direction du plan suivant lequel s'opère la division, est perpendiculaire à celle de sa première opération. Les quatre cellules de la tétrade, à leur tour, se divisent en même temps comme les précédents, mais dans un troisième plan perpendiculaire aux deux autres. Ce n'est donc que successivement et non d'emblée qu'on arrive à obtenir les colonies massives caractéristiques.

La rapidité de la multiplication par division est fonction directe de la nutrition. Elle s'opère d'autant plus vite que les conditions de nutritivité sont meilleures, conditions du milieu alimentaire, conditions de

température, d'aération, etc. Quand le milieu est épuisé, la division s'arrête, les éléments tombent au fond du vase et y forment un sédiment d'aspect variable suivant l'espèce.

Quand le milieu est favorable, elle se produit avec une activité étonnante. C'est ce qui explique l'envahissement si rapide de certains milieux par les Bactéries. D'après Cohn (1), il faut deux heures aux bâtonnets issus de la division d'un bâtonnet primitif pour se diviser à leur tour. En calculant sur cette base, un élément qui trouverait réunies de bonnes conditions de milieu et n'aurait à subir aucune influence mauvaise arriverait à en produire, au bout de trois jours, quatre mille sept cent soixante-douze billions. Heureusement pour l'homme, cette prodigieuse fécondité se trouve enrayée à chaque instant.

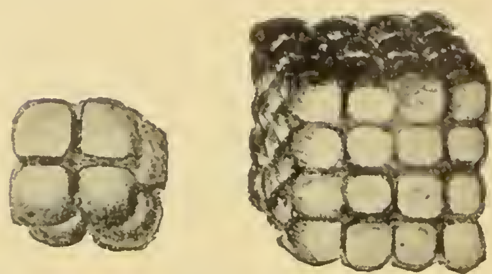


Fig. 33. — Schéma de la formation de paquets de Sarcines.

Reproduction par spores. — La multiplication par division a été pendant longtemps considérée comme le seul mode de propagation des Bactéries. Les cellules ainsi produites ne présentent, en général, qu'une faible résistance aux agents de destruction et une résistance d'autant plus faible qu'elles sont plus jeunes; la vie de l'espèce se trouverait donc compromise, si elle n'avait pas à sa disposition le moyen de surmonter ces difficultés. Ce moyen, c'est la *spore*. Lorsqu'une espèce se trouve dans les conditions de vie active ou, d'autres fois, en présence de conditions défavorables, quand le milieu nutritif s'épuise, quand arrive une privation d'eau, d'oxygène, etc., il se forme dans les cellules, par condensation de leur protoplasma, des éléments résistants capables de traverser ces périodes difficiles, des *spores durables* (*Dauersporen*). Ce n'est cependant pas dans ces seules conditions d'existence difficile que les Bactéries forment des spores. Souvent même la formation de spores se fait normalement en dehors de toute mauvaise condition d'existence; c'est un puissant moyen de rajeunissement de l'espèce.

Les spores ont été décrites pour la première fois par Pasteur, en 1869 (2). Suivant ses observations, le Bacille de la *flacherie* des vers à soie, après s'être reproduit quelque temps par division, forme, dans certaines de ses cellules, des *noyaux brillants*, qui sont de véritables *germes*, mis en liberté par résorption du bâtonnet. Ces germes supportent longtemps la dessiccation en conservant leur vitalité. Ce sont là les caractères essentiels des spores. Cohn (3) a observé plus tard et décrit avec détails précis la formation de la spore du *Bacillus subtilis*. Koch (4) en a suivi pas à pas le développement dans les cultures du *Bacillus anthracis*. Depuis, ce mode de reproduction a été constaté chez de nom-

(1) Cohn, Untersuchungen über Bacterien (*Cohn's Beitr. zur Biol. der Pflanzen*, Bd. I, 2e et 3e p.).

(2) Pasteur, Études sur les maladies des vers à soie. Paris, 1870.

(3) Cohn, Untersuchungen über Bacterien (*Cohn's Beitr. zur Biol. der Pflanzen*, Bd. I, 2e p.).

(4) R. Koch, Die Aetiologie der Milzbrandkrankeit (*Cohn's Beitr. zur Biol. der Pflanzen*, Bd. II, p. 277).

breuses espèces. Beaucoup d'autres ne l'ont jamais présenté, soit qu'elles ne le possèdent pas réellement, soit plutôt que l'on n'ait pas encore pu réaliser les conditions spéciales qui lui sont nécessaires pour se produire.

Lorsqu'un article va former une spore, s'il est mobile, il s'arrête; il se gonfle souvent, dans toute son étendue ou seulement en un point; son protoplasma devient trouble, granuleux, il s'y fait une sorte de réserve nutritive, parfois amylacée, facile alors à constater avec l'iode qui donne la coloration bleue caractéristique. Chez le *Bacillus butyricus*, par exemple, le protoplasma se contracte, se sépare de la membrane, qu'il laisse alors apparaître nettement avec un double contour. Dans le contenu se montre un point clair, une sorte de vacuole, qui grandit, prend une grande réfringence et s'entoure d'une membrane propre, assez épaisse. La spore est formée. C'est un petit corps sphérique ou ovalaire, à contours sombres, dont la masse centrale est dépourvue de granulations. Elle est d'habitude incolore; les spores du *Bacillus erythrosporus* sont colorées en rouge terne. Le contenu est une gouttelette très réfringente ayant l'aspect d'une goutte de matière grasse. Pour Koch, même, la spore du *Bacille du charbon* est formée d'une gouttelette graisseuse entourée d'une mince enveloppe protoplasmique et d'une membrane résistante. La gouttelette graisseuse lui donne sa forte réfringence et sert de réserve nutritive pour la germination. Brefeld et Prazmowski croient, au contraire, que la partie centrale réfringente est du protoplasma. C'est ce que semblent prouver les recherches de Nencki (1), qui a démontré que, chez le Bacille du charbon et des Bactéries de putréfaction, les spores sont beaucoup plus riches en matière azotée que les Bacilles, et que la matière albuminoïde se forme surtout au moment de la sporulation. La membrane qui l'entoure est épaisse; on peut parfois lui distinguer deux couches : l'*endospore*, appliquée sur le protoplasma central, et l'*exospore*, qui en est la partie la plus externe (fig. 38, p. 78). A côté de la spore se trouve un petit amas granuleux, reste du protoplasma qui n'a pas été employé à sa formation.

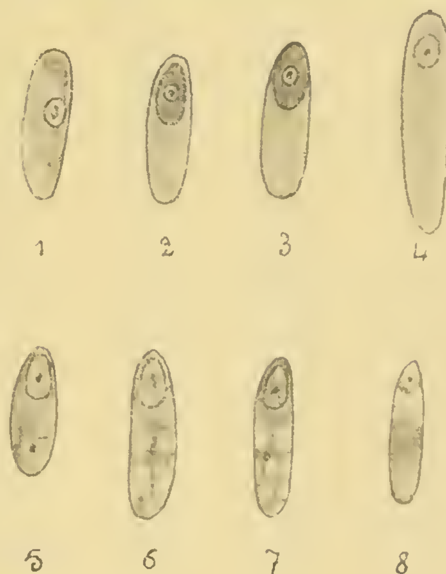


Fig. 34. — Formation de la spore chez le *Bacillus Pastorianus* (d'après A. Meyer).

Pour A. Meyer (2), chez le *Bacillus Pastorianus* (*Clostridium Pastorianum*), dans la cellule qui va sporuler à une extrémité le plus souvent, il se forme une condensation de la substance nucléaire disséminée dans le cytoplasme, un véritable noyau. Ce granule grossit, s'entoure d'une membrane, devient la spore.

D'après Schaudinn (3), le processus serait plus compliqué. Chez le *Bacillus Bütschlii*, l'élément qui va sporuler subit d'abord un commencement de division transversale; il s'y forme une mince cloison médiane, qui toutefois se résout et disparaît bientôt (fig. 35, *9*, *10*, *11*). Aux deux

(1) Nencki, Beiträge zur Biologie der Bacterien (*Virchow's Arch. für pathol. Anat.*, 1879).
(2) A. Meyer, Der Zellkern der Bakterien (*Flora*, 1908, p. 335).
(3) Schaudinn, *loc. cit.*, p. 71.

pôles de l'élément se forment de petits amas de granules de nature chromatique, alors que de la substance chromatique s'amasse en outre dans l'axe de la cellule en granulations formant une sorte de chapelet

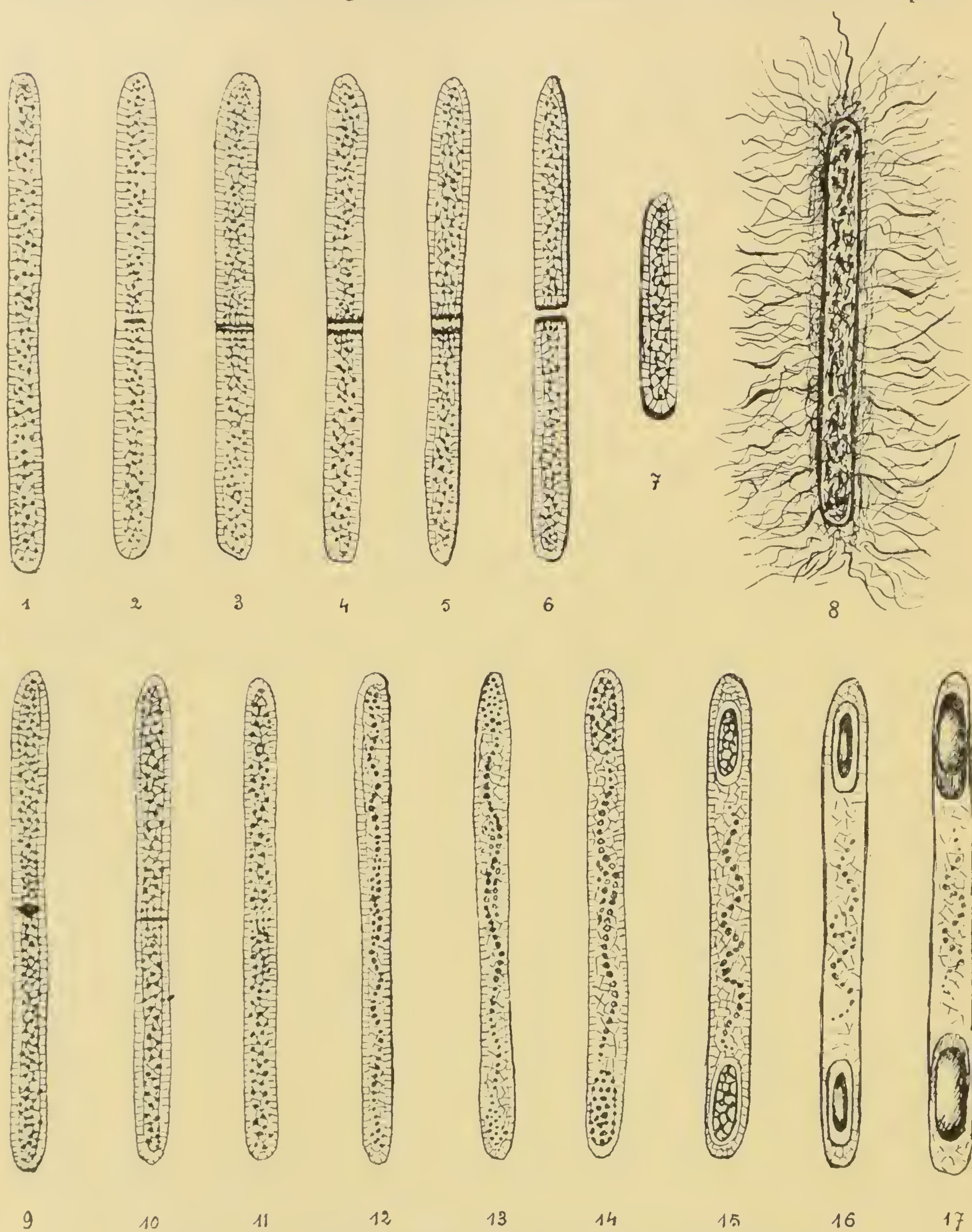


Fig. 35. — Division des bâtonnets et formation des spores chez le *Bacillus Bütschlii* (d'après Schaudinn).

1, *2*, *3*, *4*, *5*, *6*, 7, processus de division des bâtonnets; *8*, bâtonnet adulte avec cils vibratiles; *9*, *10*, *11*, *12*, *13*, *14*, *15*, *16*, *17*, stades successifs de la formation des spores. Grossissement : 1000/1.

sinueux ou vaguement spiralé (*12*, *13*, *14*). Les amas granuleux des deux pôles grandissent et se condensent, formant une masse ovoïde, réfringente, s'entourent d'une membrane qui s'épaissit vite et s'oppose alors à la pénétration des colorants; la spore est formée (*15*, *16*, *17*). Dans ce début de division, qu'il signale aussi chez le *Bacillus sporonema*, où il se manifeste seulement par un étranglement médian, fugace,

Schaudinn pense voir un indice d'une différenciation sexuelle : pour Dobell (1), ce ne serait qu'une simple division qui resterait incomplète, anomalie fixée chez quelques espèces.

Il ne se forme, dans la très grande majorité des cas, qu'une seule spore

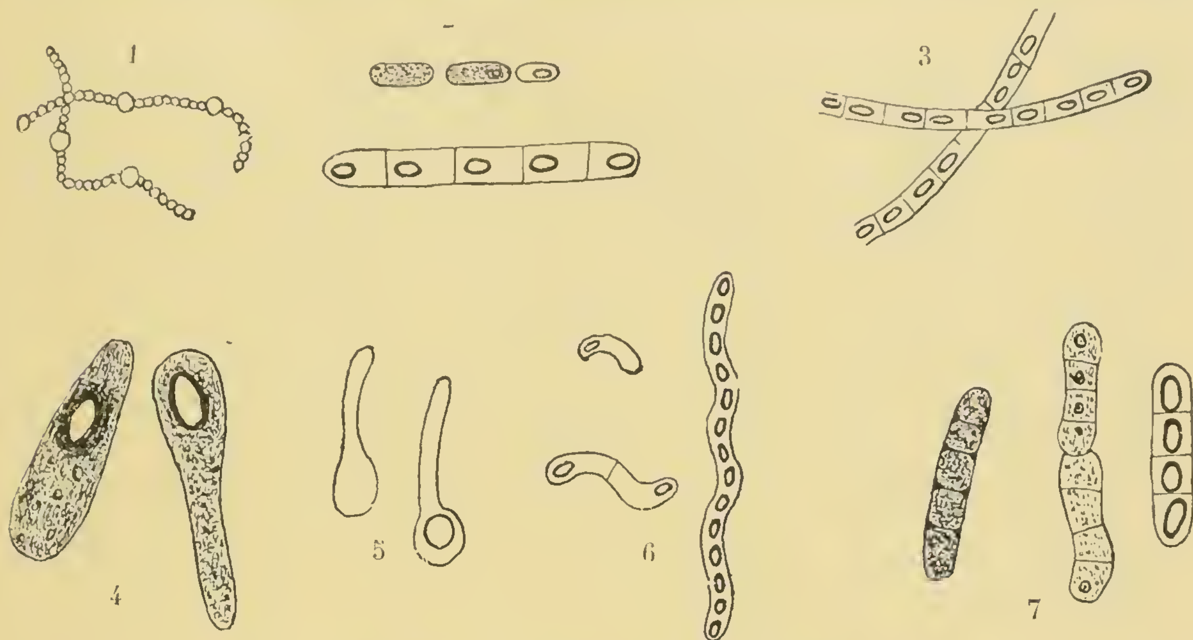


Fig. 36. — Formation des spores.

1, chez *Leuconostoc mesenteroides* ; *2*, chez *Bacillus subtilis* ; *3*, chez *Bacillus anthracis* ; *4*, chez *Bacillus butyricus* ; *5*, chez *Spirillum rugula* ; *6*, chez une espèce de *Spirillum* ; *7*, chez *Bacillus megaterium*.

par article dans les filaments ; la grande minceur des cloisons, ou leur disparition, peuvent faire croire à la présence de chapelets de spores. Chez quelques espèces, le *Bacillus caucasicus* du kéfir, le *Bacillus Bütschlii*, il semble se former deux spores aux extrémités opposées des bâtonnets ; le début de division de l'élément qui se prépare à sporuler les ferait rentrer dans la règle générale. La spore peut être plus petite ou égale en diamètre au filament. Elle est souvent plus grosse ; dans ce cas, le bâtonnet se renfle à l'endroit où se produit la spore, prend une forme de fuseau quand elle se produit en son milieu, de massue ou de têtard quand elle se produit à une extrémité (fig. 37, *4*, *5*).

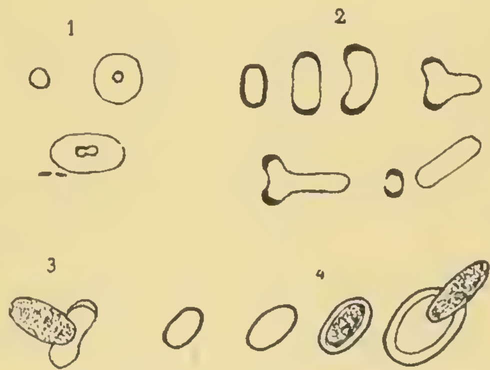


Fig. 37. — Germination des spores.

1, *Leuconostoc mesenteroides* ; 2, *Bacillus subtilis* ; 3, *Bacillus megaterium* ; 4, *Bacillus butyricus*.

Les spores sont mises en liberté par gélification de la membrane des bâtonnets qui les ont produites. Tantôt elles peuvent germer de suite, tantôt elles ont besoin d'une période de repos. La germination se fait dans la direction du filament mère, ou, plus rarement, dans un sens perpendiculaire (2). Il est facile de se rendre compte de ces différences

(1) Dobell, On the so-called sexual method of spore formation in the disporic Bacteria (*Quarterly Journ. of microsc. sc.*, LIII, 1909).

(2) Grethe, Ueber die Keimung der Bakteriensporen (*Fortschr. der Med.*, 1897, p. 43, 81, 135).

en observant des spores ovales. Lorsque la spore est dans des conditions convenables pour germer, elle pâlit, la membrane se rompt, il en sort un petit prolongement qui, en très peu de temps, gagne l'aspect et les dimensions des cellules végétatives ordinaires de l'espèce. Pour les auteurs qui admettent la présence de deux couches à la membrane, c'est l'exospore qui se rompt; l'endospore constitue la membrane du jeune bâtonnet (1). Les deux valves de la membrane restent parfois accolées plus ou moins longtemps à la base du bâtonnet qui en est sorti, puis elles se gélifient et se dissolvent. On peut observer la germination des spores en prenant des cellules qui en renferment et en les mettant dans une gouttelette de liquide nutritif, après avoir pris la précaution de dessécher légèrement les spores sur la lamelle pour les empêcher de se répandre dans le liquide.



Fig. 38. — Spores du *Bacillus Butschlii* (d'après Schaudinn).

2, début de germination.

La succession de ces phénomènes s'observe on ne peut mieux sur la figure 39, qui représente, d'après De Bary, les divers stades du développement du *Bacillus megaterium*. Les bâtonnets qui vont sporuler se segmentent de façon à donner des articles beaucoup moins longs (2) que les cellules végétatives ordinaires (1). Dans chacun d'eux il apparaît, au centre du protoplasma granuleux, un noyau qui, d'abord très petit (*3*, *4*), grandit peu à peu et prend les caractères des spores (*5*, *6*). Lorsque

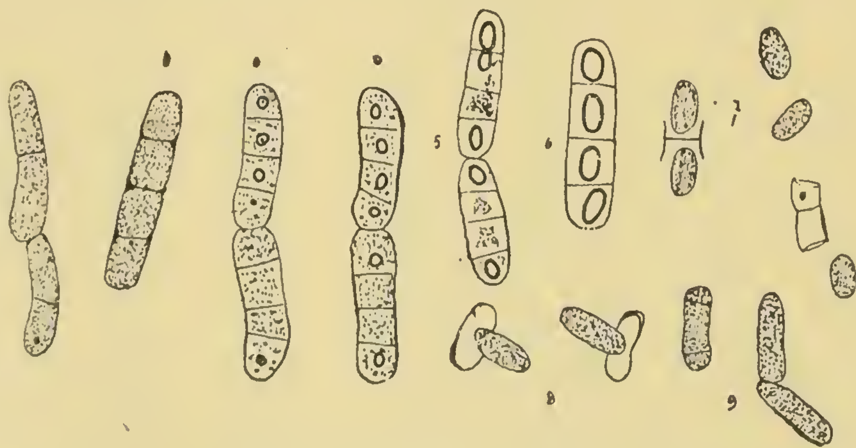


Fig. 39. — *Bacillus megaterium*, 600/1 (d'après De Bary).

la spore est bien formée, la membrane des bâtonnets pâlit, devient diffluente et laisse sortir, en se déchirant, les spores qui se trouvent libres dans le liquide ambiant (*7*). La spore germe au bout de peu de temps; sa membrane se rompt dans le sens du petit diamètre de l'ovale qu'elle forme ; il en sort un prolongement hyalin qui croît et donne une cellule végétative ordinaire (*8*, *9*). Les débris de la membrane de la spore disparaissent rapidement par gélification.

Les phénomènes peuvent se passer autrement. Chez le *Bacillus sub-*

(1) Muhlschlegel, Ueber die Bildung und den Bau der Bakteriensporen (*Centralbl. für Bakt.*, 2te Abth., VI, 1900, p. 64 et 96).

tilis et les autres espèces très voisines confondues sous le nom de *Bacilles du foin*, la spore se transformerait directement en bâtonnet. Elle grandit en même temps qu'elle perd sa réfringence et devient pâle ; elle prend une forme cylindrique et bientôt ne se différencie plus des cellules végétatives ordinaires.

Les particularités qui viennent d'être décrites sont les phénomènes généraux, typiques, pour ainsi dire, de la formation des spores. Plusieurs espèces étudiées à ce point de vue présentent des différences dont quelques-unes sont intéressantes à connaître.

Chez les *Bacillus subtilis*, *B. anthracis*, *B. megaterium* (fig. 36, *2*, *3*, *7*), les spores ont une largeur moindre que la cellule mère.

Les bâtonnets de *Bacillus butyricus* se renflent à l'endroit où se produit la spore et prennent une forme de têtard ou de fuseau (fig. 36, *4*). De plus, au moment où ils vont sporuler, le protoplasma renferme une assez forte quantité de matière amylacée soluble, de granulose, qui leur donne la propriété de bleuir, lorsqu'on les traite par l'iode. D'après Prazmowski (1), au moment de la germination, il se forme, à l'un des pôles, un orifice par résorption de la membrane ; c'est par ce trou que sort la jeune cellule, sous forme d'un prolongement hyalin (fig. 37, *4*). La spore de cette espèce, transportée dans un milieu nutritif frais, germe au bout de une heure et demie à deux heures.

La spore du *Spirillum rugula* se forme toujours à une extrémité qui se renfle fortement ; le bâtonnet, légèrement courbé, prend la forme d'une grosse virgule ou d'une massue (fig. 36, *5*).

Les Bactéries en spirales se divisent en articles, qui produisent chacun une spore de diamètre plus petit que le leur (fig. 36, *6*). Les spores du *Spirillum endoparagogicum* germent dans l'intérieur du filament mère, qui peut porter les Spirilles de seconde génération comme autant de rameaux latéraux (fig. 40).

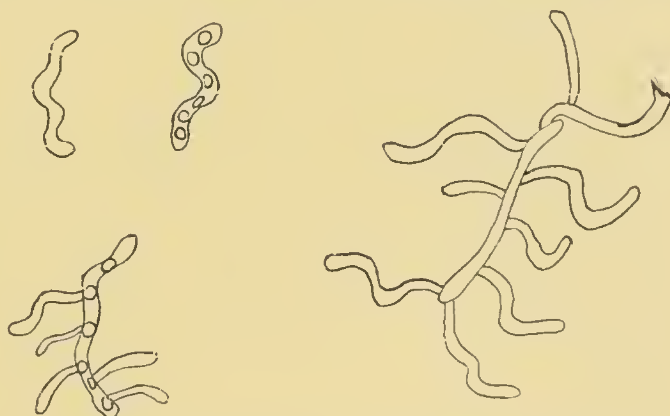


Fig. 40. — *Spirillum endoparagogicum* (d'après Sorokin).

Les espèces qui présentent les phénomènes ci-dessus décrits ont des spores formées à l'intérieur des cellules végétatives ; ce sont des *Bactéries endosporées*. Beaucoup d'autres Bactéries, les formes sphériques notamment, présentent une moins grande complexité ; il est difficile ou même impossible de distinguer leurs spores des cellules ordinaires, si tant est qu'elles en produisent. C'est à ces espèces que De Bary (2) réserve le nom de *Bactéries arthrosporées*. Les cellules qui vont être des *arthrospores* se différencient très peu, souvent même pas du tout, des voisines ; la cellule entière, en se modifiant peu ou même pas comme aspect, se transformerait en spore. La seule caractéristique vraie de ces

(1) Prazmowski, Untersuchungen über die Entwickelungsgeschichte und Fermentwirkung einiger Bacterienarten. Leipzig, 1880.

(2) De Bary, Vergleichende Morphologie und Biologie der Pilze, Mycetozoen und Bacterien. Leipzig, 1884 ; et Leçons sur les Bactéries, traduction par Wasserzug. Paris, 1886.

arthrospores est la résistance plus grande aux causes de destruction et la propriété de donner naissance, après leur isolement, à de nouvelles colonies. Il faut même refuser ces spores exogènes à bien des *Micrococcus*, qui sont tués par de faibles élévations de température qui respecteraient certainement des éléments quelque peu durables.

Prove (1) a décrit la formation des spores dans une espèce de *Micrococcus* qu'il a isolée de l'urine, le *Micrococcus ochroleucus*. Les dimensions des éléments ordinaires, sphériques, sont de 0,5 μ à 0,8 μ. Ceux qui vont sporuler se gonflent jusqu'à atteindre un volume triple; il se forme à leur intérieur une sphère réfringente qui peut avoir 1,6 μ de diamètre. Les cultures qui renferment de tels éléments fertilisent encore de nouveaux milieux après avoir été soumises pendant une demi-heure à une température de 100°. Ce sont bien là les caractères essentiels des spores.

Chez les *Sarcines*, la formation des spores n'a été observée que sur une espèce, *Sarcina pulmonum*, isolée par Hauser (2) des crachats d'un phtisique. Certains éléments des cultures augmentent de volume; leur contenu devient trouble. La partie centrale, la plus considérable de ce contenu, se contracte et acquiert une plus grande réfringence, pendant qu'il se forme à sa périphérie une sorte de membrane sombre. Il se constitue ainsi un corps sphérique, brillant, très réfringent, mesurant de 0,6 μ à 0,8 μ de diamètre. Cette spore peut être mise en liberté par la diffluence de la membrane de la cellule mère. Elle a les propriétés habituelles, en particulier la grande résistance aux agents de destruction; elle résiste à une température de 110°.

Chez le *Leuconostoc mesenteroides* de la *gomme de sucreries*, il se forme de véritables *arthrospores*, bien étudiées par Van Tieghem (3). Quelques cellules, éparses dans les chapelets sinueux de coccus, deviennent plus grosses que les autres, gagnent un aspect plus réfringent et épaississent leur membrane. Ce sont des spores véritables (fig. 37, *I*), car seules elles résistent à la dessiccation et à la privation de nourriture. Semées dans un milieu frais, leur membrane externe dure se rompt; il se forme aux dépens de la couche interne une épaisse gaine de gelée, enveloppant la masse protoplasmique centrale, qui, par division, a bientôt donné naissance à un des chapelets si particuliers à l'espèce (fig. 16, p. 33, et fig. 36, *I*). Les *Cladothrix* paraissent former leurs spores en longs chapelets par la simple segmentation des filaments; ce sont des arthrospores typiques (fig. 2, p. 13).

Il est des cas où il paraît se former, par simple condensation du protoplasma des éléments, des masses réfringentes, dépourvues d'enveloppe propre, que l'on doit très probablement considérer comme des spores moins perfectionnées; elles résisteraient aussi plus aux causes de destruction que le protoplasma ordinaire et auraient peut-être certain rapport avec des granulations dont il a été parlé précédemment (p. 24).

Le caractère principal de la spore est sa résistance à des conditions de vie que les simples cellules végétatives ne peuvent traverser sans

(1) Prove, Micrococcus ochroleucus eine neue chromogene Spaltpilzform (*Beitr. zur Biol. der Pflanzen*, IV, 3, p. 409, 1887).

(2) Hauser, Ueber Lungensarcine (*Deutsche Arch. für klin. Med.*, 1887, p. 127).

(3) Van Tieghem, Sur la gomme de sucreries (*Ann. des sc. nat.*, *Bot.*, 6e série, VII).

périr (1). Beaucoup supportent des températures de 100° et au-dessus sans perdre leur faculté germinative. Une dessiccation prolongée, l'oxygène comprimé, la privation d'air, qui tuent très vite les éléments végétatifs, sont sans action sur la spore. Cette résistance aux agents de destruction paraît due, en grande partie, à l'extrême cohésion de la membrane, qui est telle que Büchner (2) a pu faire germer des spores de *Bacillus subtilis* ayant séjourné dans de l'acide sulfurique concentré. La spore ne l'offre qu'après s'être entourée de sa membrane ; très jeune, elle est aussi sensible que les éléments ordinaires ; il en est de même au moment où elle se modifie pour la germination. De là vient aussi la difficulté qu'on éprouve à colorer les spores ; on verra plus loin qu'il faut, pour y arriver, vaincre l'imperméabilité de la membrane, en faisant agir sur elle la chaleur, les acides ou les alcalis, pour permettre aux solutions colorantes de diffuser dans son intérieur et imprégner le protoplasma central.

Si l'on rapproche de ces caractères des spores leur extrême petitesse et leur transport facile par l'air ou d'autres véhicules, on comprendra facilement quel grand rôle elles doivent jouer dans la dispersion des Bactéries et la contamination des milieux morts ou vivants.

Le *Bacille du charbon*, sous des influences peu déterminées encore, peut perdre la propriété de produire des spores dans les conditions où il les forme normalement. Chamberland et Roux (3) l'ont observé sur des filaments soumis quelque temps à l'action d'une solution faible de bichromate de potasse, ou, mieux, comme Roux l'a remarqué depuis (4), en ajoutant au bouillon qui sert pour les cultures une petite proportion d'acide phénique, de 2 à 20 p. 10000. Les cultures n'en présentent plus même après un grand nombre de générations. Elles conservent cependant leur pouvoir pathogène ; inoculées à des cobayes, elles les font rapidement périr ; les Bactéries qui ont passé par l'organisme sont tout aussi incapables de former des spores. Lehmann (5) a observé plus récemment le même fait. Il a isolé une variété « asporogène » du *Bacille du charbon* de cultures sur gélatine longtemps renouvelées. Dans les cultures sur pomme de terre de cette race, il a observé des sphères plus rondes et plus petites que les spores ordinaires, qu'il nomme *microspores*. C'est à tort qu'il les rapproche des spores vraies ; elles n'en possèdent pas les propriétés biologiques ; chauffées à 60°, elles perdent toute virulence et périssent ; il n'en a jamais observé la germination.

Behring (6) a obtenu du charbon asporogène en cultivant du charbon normal dans de la gélatine additionnée d'acide chlorhydrique ou d'acide rosolique, pendant deux à trois mois, à la température de la chambre. Physalix (7) est arrivé au même résultat en faisant des cultures en série

(1) SWAN, Resisting vitality of spores of Bacillus (*Ann. of Bot.*, 1893, n° 3).

(2) BÜCHNER, Ueber das Verhalten der Spaltpilzsporen gegen Anilinfarbstoffe (*Aertzliche Intelligenzbl.*, 1884).

(3) CHAMBERLAND et ROUX, *C. R. de l'Acad. des sc.*, 1883, p. 1090.

(4) ROUX, Bactéridie charbonneuse asporogène (*Ann. de l'Inst. Pasteur*, 1890).

(5) LEHMANN, Ueber die Sporenbildung bei Milzbrand (*Münch. med. Wochenschr.*, 1887, n° 26).

(6) BEHRING, Beitrage zur Ætiologie des Milzbrandes (*Zeitschr. für Hygiene*, VII, 1899).

(7) PHYSALIX, Influence de la chaleur sur la propriété sporogène du *Bacillus anthracis* (*Arch. de physiol.*, 1893, p. 217).

à 42°. Surmont et Arnould (1), après avoir essayé ces différents procédés, donnent la préférence au procédé de Roux à l'acide phénique. Certaines cultures de *Bacille du charbon* offrent une très grande résistance aux agents capables de les transformer en races asporogènes ; il faut alors, pour réussir, diminuer un peu la vitalité du microbe en faisant des cultures successives à une température de 42°, qui est déjà pour cette espèce une température dysgénésique. G. Rosenthal (2), cultivant ce même Bacille à l'abri de l'oxygène, a vu qu'il perdait son pouvoir sporogène, tout en conservant intégralement ses propriétés biologiques. En somme, il semble que le *Bacille du charbon* perd facilement la propriété de donner des spores quand les conditions de culture sont défavorables.

II. — ACTION DE DIFFÉRENTS AGENTS SUR LES BACTÉRIES

Les Bactéries sont soumises, au même titre que les autres êtres, à l'influence des milieux dans lesquels elles se trouvent. Suivant la composition chimique, suivant l'état physique de ces milieux, il se produit, pour une espèce donnée, des modifications dans les propriétés et les manifestations vitales. Il est, pour elles, des substances et des conditions favorables à l'accroissement, d'autres qui entravent leur multiplication et suppriment complètement la possibilité de vivre. Les influences mauvaises arrêtent d'abord les manifestations extérieures, chimiques ou biologiques, tout en laissant la nutrition se faire tant bien que mal. Si leur action continue, la nutrition est suspendue, la multiplication végétative ne peut plus se faire, la mort peut survenir ; c'est alors parfois que se produisent les spores, pour résister à des conditions qui font périr les simples cellules végétatives.

Nous étudierons en premier lieu l'action de quelques substances chimiques et ensuite celle des agents physiques les plus importants.

De plus, dans les différents milieux où peuvent se développer des Bactéries, vivent fréquemment d'autres êtres, organismes inférieurs plus ou moins différents ou même espèces voisines, dont l'influence sur les premières est souvent importante. Il est nécessaire d'en tenir compte et de signaler au moins les faits, s'il n'est pas encore possible de donner sur ce point des idées générales bien assises.

1° Agents chimiques.

L'*oxygène* est absolument nécessaire aux aérobies. Lorsqu'on veut les cultiver dans des gaz inertes, l'azote ou l'hydrogène, par exemple, on n'obtient aucun résultat. Par contre, dans des conditions particulières, la présence d'air peut considérablement nuire. Duclaux (3) a démontré que lorsqu'une espèce a épuisé son milieu nutritif, si elle trouve de l'oxygène en abondance, elle s'affaiblit peu à peu et meurt au bout d'un temps qui doit être assez long. Si, au contraire, elle n'a à consommer que de très minimes portions de ce gaz, sa vitalité se conserve bien plus longtemps que dans le premier cas.

(1) Surmont et Arnould, Recherches sur la production du *Bacille du charbon* asporogène (*Ann. de l'Inst. Pasteur*, 1894, p. 817).

(2) G. Rosenthal, *Soc. de l'internat des hôpitaux de Paris*, 26 juillet 1906.

(3) Duclaux, Chimie biologique, p. 115.

Lorsqu'on laisse *vieillir*, en présence de l'air, une culture de *Micrococcus du choléra des poules*, sa virulence diminue graduellement et il arrive un moment où on la trouve éteinte. Pasteur (1), en maintenant indéfiniment la virulence d'une même culture faite à l'abri de l'air, a prouvé que le phénomène était bien dû à l'oxygène.

Cette influence débilitante de l'oxygène ne paraît agir que sur les cellules végétatives. Les spores lui résistent, en conservant, même au bout d'un temps très long, la propriété de germer. Elles reproduisent alors des cellules douées des qualités typiques de l'espèce.

C'est pourquoi il a fallu, dans la préparation de cultures atténuées par l'air pour la vaccination, écarter toute présence de spores. Pasteur et ses savants collaborateurs Chamberland et Roux (2) ont réussi à le faire pour la *Bactérie du charbon* en la cultivant, dans des bouillons, à 42°-43°. A cette température, en effet, le développement est abondant, mais la formation des spores est impossible.

Ce que fait le contact prolongé de l'oxygène, l'oxygène comprimé le produit en très peu de temps. P. Bert (3), en se servant d'oxygène comprimé à 8 ou 10 atmosphères, arrêtait la fermentation et la putréfaction. Les cellules végétatives sont tuées, mais les spores, comme l'a montré Pasteur (4), supportent sans périr ces conditions, si toutefois elles n'agissent pas pendant une durée trop longue.

Pour les anaérobies, la chose est tout autre. L'oxygène libre est un véritable agent toxique, mais seulement à une certaine tension (p. 47). Ils ont peut-être besoin, pour commencer à végéter, d'en avoir à consommer des quantités très minimes; la proportion qui se trouve dans l'air est de beaucoup trop forte et les tue ; il faut, pour qu'ils puissent le supporter, les y entraîner progressivement. L'*eau oxygénée* a une action plus énergique que l'oxygène (Voy. p. 88) ; elle est plus active que l'oxygène gazeux.

L'*ozone*, d'après les recherches de Chappuis (5), de Christmas (6), d'Ohlmüller (7), a un pouvoir microbicide très net ; on l'utilise pour la stérilisation en grand des eaux potables (8). D'après Ransome et Foulerton (9), l'ozone sec n'aurait pas d'action : passant dans un milieu liquide, il présenterait, par contre, des propriétés bactéricides énergiques.

L'*hydrogène* et l'*azote* semblent n'avoir aucune action sur les Bactéries;

(1) PASTEUR, De l'atténuation du virus du choléra des poules (*C. R. de l'Acad. des sc.*, XC, 1880, p. 673).

(2) PASTEUR, CHAMBERLAND et ROUX, Le vaccin du charbon (*Ibid.*, XCII, 1881, p. 666).

(3) P. BERT, Oxygène comprimé (*C. R. de l'Acad. des sc.*, LXXX, p. 1579, et LXXXIV, p. 1130).

(4) PASTEUR, Atténuation du virus charbonneux (*C. R. de l'Acad. des sc.*, XCII, 1881).

(5) CHAPPUIS, Action de l'ozone sur les germes contenus dans l'air (*Bull. de la Soc. chim.*, 1881, p. 290).

(6) CHRISTMAS, Valeur antiseptique de l'ozone (*Ann. de l'Inst. Pasteur*, 1893 p. 776).

(7) OHLMÜLLER, Ueber die Einwirkung des Ozons über Bakterien (*Arb. aus dem Kaiserl. Gesundheitsamte*, VIII, 1892, p. 228).

(8) VAN ERMENGHEM, De la stérilisation des eaux par l'ozone (*Ann. de l'Inst. Pasteur*, IX, 1895, p. 673). — WEYL, Keimfreies Trinkwasser mittelst Ozon (*Centralbl für Bakt.*, 1899, XXVI, p. 15). — MARMIER et ABRAHAM, La stérilisation industrielle des eaux potables par l'ozone (*Revue d'hygiène*, 1899, n° 6, p. 540).

(9) RANSOME et FOULERTON, *The Lancet*, 2 mars 1901.

aussi est-ce à eux, au premier surtout, à cause de la facilité plus grande de sa préparation, que l'on doit s'adresser lorsqu'on veut obtenir un milieu gazeux inerte, pour la culture des anaérobies, par exemple.

L'*acide carbonique* peut, d'après Kolbe (1), empêcher pendant assez longtemps la putréfaction de la viande. Sa présence serait nuisible au moins pour beaucoup d'espèces aérobies.

Cependant, les expériences de Fraenkel (2) montrent que cette nocivité de l'acide carbonique est loin d'être aussi générale qu'on le pensait. Le *Bacille typhique*, le *Pneumocoque de Friedländer*, le *Bacille de la fermentation lactique* de Hüppe, entre autres, végéteraient tout aussi bien dans l'acide carbonique que dans l'air ; d'autres, *Micrococcus prodigiosus*, *Proteus vulgaris*, *Bacillus phosphorescens*, s'y développent aussi, mais lentement et peu abondamment. Le *Bacille du charbon*, le *Spirille du choléra*, par contre, ne montrent aucun développement dans ces mêmes conditions.

D'après Altana (3), l'acide carbonique aurait sur les Bactéries une véritable action toxique. Dans ce gaz pur, le *Pneumobacille* pousserait bien ; le *Colibacille*, le *Bacille typhique* et les espèces voisines végéteraient peu et lentement ; beaucoup d'autres, le *Bacillus subtilis*, le *Bacille de la diphtérie*, les *Vibrions cholériques*, beaucoup de chromogènes, tous les anaérobies ne se développeraient pas. Dans un mélange d'acide carbonique et d'oxygène à la même tension que l'air, les espèces du groupe du *Colibacille* pousseraient bien, les autres pas du tout.

L'*oxyde de carbone* n'aurait aucun effet délétère.

L'action de l'*hydrogène sulfuré* sur les Bactéries paraît être des plus variable.

Plusieurs espèces peuvent vivre et prospérer dans des milieux contenant de fortes proportions de ce gaz. Les Bactéries pullulent souvent dans les eaux sulfureuses. Miquel (4) a isolé d'une eau d'égout une Bactérie anaérobie qui produit de fortes quantités de H^2S, *Bacillus sulfhydrogenus*. La présence de ce gaz devient toutefois nuisible lorsqu'il atteint une certaine tension. Rosenheim (5) a retiré d'une urine, contenant dès son émission de fortes quantités d'hydrogène sulfuré, une Bactérie ne liquéfiant pas la gélatine et pullulant très lentement dans l'urine fraîche, où elle donne un abondant dégagement de ce gaz. Beaucoup d'espèces communes en donnent de notables proportions lorsqu'elles trouvent du soufre à attaquer, libre ou faiblement combiné, dans l'albumine par exemple. La réaction se produit probablement de la façon suivante : l'hydrogène, mis en liberté par l'absorption d'oxygène provoquée par la Bactérie, réagit à l'état naissant sur les composés qui retiennent assez faiblement leur soufre et donne de l'hydrogène sulfuré.

L'hydrogène sulfuré, très toxique pour les plantes vertes, l'est bien moins ici à cause de l'absence de chlorophylle, sur laquelle se porte surtout son action nuisible.

(1) Kolbe, *Journ. für prakt. Chemie*, vol. XXVI.

(2) Fraenkel, Die Einwirkung der Kohlensäure auf die Lebensthätigkeit der Mikroorganismen (*Zeitschr. für Hygiene*, V).

(3) Altana, Sulla azione tossica della anidride carbonica sui microorganismi (*Riv. d'Igiene di sanit. publ.*, 1907, p. 293).

(4) Miquel, Sur la fermentation sulfhydrique (*Bull. de la Soc. chim.*, XXXII, p. 12).

(5) Rosenheim, Société de médecine interne de Berlin, 6 juin 1887.

L'*hydrogène protocarboné*, qui se produit toujours dans la fermentation de la cellulose, et l'*hydrogène phosphoré*, si commun dans les putréfactions, paraissent n'avoir aucune action.

ANTISEPTIQUES

Les substances chimiques qui entravent ou arrêtent le développement des Bactéries dans un milieu propice, inerte ou vivant, ou arrivent à les détruire, sont nombreuses. On sait qu'elles ont reçu le nom d'*antiseptiques*. Il est impossible de les étudier ici avec détails à cause de leur multiplicité et de la variabilité de leur action. Une classification méthodique n'en peut être donnée actuellement ; à côté de produits gazeux, d'acides, de sels minéraux, nous trouvons des alcools, des aldéhydes, des huiles essentielles, des phénols, des composés organiques plus complexes encore. Deux considérations doivent surtout guider dans le choix d'un antiseptique, sa puissance d'abord et ensuite sa facilité d'emploi, son côté pratique.

Pour apprécier l'action d'un antiseptique, on peut user de différents moyens. On peut faire agir l'antiseptique directement sur un microbe bien vivant et actif et noter le temps que celui-ci met à dépérir, s'atténuer et mourir tout à fait. Des parcelles de cultures en nature, ou des fils de soie imprégnés de culture puis séchés, servent à instituer l'expérience. Ou bien, on peut simplement chercher à déterminer quelle est la proportion minime de l'antiseptique nécessaire pour empêcher le développement du microbe dans un milieu favorable, tout en lui laissant la vie, ou, mieux, celle qui est nécessaire pour le tuer d'une façon sûre.

L'action des antiseptiques varie, du reste, dans de larges limites suivant les espèces et même, parfois, pour une même espèce, suivant ses conditions de vie. C'est la raison pour laquelle il y a un tel désaccord dans les expériences faites jusqu'alors. Ces expériences sont même très peu comparables entre elles, parce qu'elles ont été faites dans des conditions trop différentes. Toutes les particularités intéressantes seront citées lors de la description des espèces.

Le **sublimé corrosif** est un des meilleurs antiseptiques, malgré quelques inégalités d'action, dues à des particularités spéciales provenant de l'espèce microbienne ou du milieu ; c'est aussi un des plus employés.

Davaine (1), l'expérimentant sur le sang charbonneux, observait qu'à la dose de 1 p. 150 000 la virulence était détruite ; que les spores de la Bactéridie étaient tuées en quelques heures par une solution à 1 p. 5 000 et en quelques minutes par celle à 1 p. 1 000. Ces résultats ont été confirmés par les recherches de Koch (2). Miquel (3) le déclare infertilisant à 1 p. 14 000. Van Ermenghem (4) a constaté que le *Spirille*

(1) Davaine, Rech. rel. à l'action des substances antiseptiques sur le virus de la septicémie (*Gazette médicale*, 1874). — Réimprimé dans « l'Œuvre de Davaine », Paris, 1889.

(2) Koch, Zur Aetiologie der Milzbrandes (*Mitth. aus d. Kaiserl. Gesundheitsamte*, 1881, I, p. 40).

(3) Miquel, *Annuaire de l'Observatoire de Montsouris*, 1883 et 1884.

(4) Van Ermenghem, Le microbe du choléra asiatique, 1885.

du choléra, en culture dans le bouillon, est tué en une heure par le sublimé à 1 p. 60 000 ; dans le sang, pour arriver à ce résultat il faut arriver à la dose de 1 p. 1 000, sans doute à cause de la coagulation de la matière albuminoïde, qui forme une coque protectrice se laissant plus difficilement pénétrer par le réactif. Fraenkel (1) trouve que la solution à 1 p. 1 000 tue en une demi-heure le *Bacille typhique*, le *Spirille du choléra*, le *Bacille de la septicémie de la souris*, et celle à 1 p. 10 000 en deux heures.

Yersin (2) a vu le *Bacille de la tuberculose*, des cultures, partiellement tué après un séjour de cinq minutes dans la solution à 1 p. 1 000, complètement tué après dix minutes. L'action sur les crachats tuberculeux est moins régulière, à cause de la coagulation de l'albumine ; Schill et Fischer (3) ont détruit toute virulence après un contact de vingt-quatre heures avec une solution à 1 p. 2 000.

Tarnier et Vignal (4) affirment que le *Streptocoque pyogène* périt après deux minutes avec la solution à 1 p. 1 000.

Viquerat (5) dit que le sublimé à 1 p. 1 000 tue en quinze minutes le *Bacille typhique*, le *Bacille du charbon*, le *Staphylocoque doré* et le *Bacille pyocyanique*.

Borkhoff (6) trouve que la solution à 1 p. 1 000 fait périr le *Spirille du choléra* et le *Bacille du charbon* sans spores après quinze secondes, le *Bacille typhique* après cinquante minutes, le *Bacille de la diphtérie* après soixante-dix à quatre-vingts minutes, le *Staphylocoque doré* après deux heures et demie à cinq heures, les spores charbonneuses après neuf à dix heures. Les solutions plus fortes, 2 p. 1 000, ou 5 p. 1 000 agissent beaucoup plus rapidement.

La solution à 1 p. 1 000 est la plus employée, sous le nom de *liqueur de Van Swieten* ; elle suffit largement pour tuer en peu de temps les Bactéries sans spores. Pour agir sur les spores, il est bon de prendre le titre 2 p. 1 000.

D'après les recherches de Geppert (7), confirmées depuis par Chavigny (8), l'effet des solutions de sublimé, surtout de celle à 1 p. 1 000, employée le plus souvent, serait loin d'être aussi complet qu'il paraît l'être. Il n'y aurait pas mort réelle des microbes qui ont subi l'action de l'antiseptique, mais un simple obstacle à leur développement, causé par la présence d'une petite quantité d'antiseptique fixé à leur surface.

La meilleure preuve est la multiplication de ces microbes lorsqu'on les a au préalable débarrassés de l'antiseptique qui les imprégnait par

(1) Fraenkel, Die desinficirenden Eigenschaften der Cresole, ein Beitrag zur Desinfectionsfrage (*Zeitschr. für Hygiene*, VI, 1889, p. 521).

(2) Yersin, De l'action de quelques antiseptiques et de la chaleur sur le Bacille de la tuberculose (*Ann. de l'Inst. Pasteur*, II, 1888, p. 60).

(3) Schill et Fischer, *Mitth. aus d. Kaiserl. Gesundheitsamte*, II, 1884, p. 131.

(4) Tarnier et Vignal, Rech. expér. rel. à l'action de quelques antiseptiques sur le Streptocoque et le Staphylocoque pyogènes (*Arch. de méd. expér.*, II, 1890, p. 469).

(5) Viquerat, Étude comparative sur la valeur antiseptique des solutions de biiodure, de bichlorure de mercure et de fluosilicate de fer (*Ann. de micr.*, II, 1889, p. 219 et 275).

(6) Borkhoff, Propriétés antiseptiques du sublimé. Thèse de Saint-Pétersbourg. 1897.

(7) Geppert, Zur Lehre von den Antisepticis (*Berl. klin. Wochenschr.*, 1889, nos 36 et 37). — Id., Ueber desinficirende Mittel und Methoden (*Ibid.*, 1890, n° 11).

(8) Chavigny, Sur la valeur des pulvérisations de sublimé (*Ann. de l'Inst. Pasteur*, X, 1896, p. 351).

lavage à certaines substances, le sulfhydrate d'ammoniaque par exemple. Toutefois, il est bon de remarquer qu'une telle expérience ne réussit que quand le contact avec l'antiseptique n'a été que très peu prolongé ; lorsqu'il a suffisamment duré, plusieurs heures, par exemple, et qu'il a été bien assuré, c'est une mort réelle que l'on observe.

On a préconisé d'autres sels de mercure. Le *biiodure de mercure* est aussi très actif, mais paraît inférieur au sublimé. L'*oxycyanure de mercure* aurait certains avantages ; d'après Boer (1), la solution à 1 p. 3000 tue en deux heures le *Bacille du charbon*, le *Bacille de la diphtérie*, le *Bacille de la morve*, le *Bacille typhique*. L'azotate, l'acétate, le cyanure de mercure seraient moins actifs (2).

Le **nitrate d'argent** est signalé depuis longtemps comme un antiseptique puissant. Behring (3) dit en avoir obtenu d'excellents effets ; Boer (4) a observé qu'il tuait rapidement le *Bacille de la diphtérie* à 1 p. 2500, le *Bacille typhique*, le *Bacille de la morve*, le *Spirille du choléra* à 1 p. 4000. L'*argent colloïdal* a une action antiseptique marquée, d'autant plus nette que ses grains sont plus fins ; 1 p. 50000 d'argent très fin empêche complètement le développement du *Bacille du charbon*, du *Staphylocoque pyogène* et du *Bacille pyocyanique* (5). L'argent à gros grains est beaucoup moins actif. L'action de l'argent colloïdal paraît tenir à ses propriétés oxydantes. Mélangé aux toxines microbiennes, il peut détruire leur activité.

L'**acide sulfureux**, en solution à 1 p. 2000, tue rapidement les microbes pyogènes, le *Bacille typhique*, le *Spirille du choléra*. Pour les spores, il faut un contact très prolongé, six à sept jours, et l'emploi de doses plus fortes, 1 p. 100.

A l'état gazeux, Sternberg (6) a remarqué que les microbes pyogènes périssent en dix-huit heures dans une atmosphère sèche à 20 p. 100, mais que les spores résistaient ; l'humidité augmente le pouvoir antiseptique. A propos de ce corps, les recherches sont absolument contradictoires et demanderaient à être reprises.

L'**aldéhyde formique** doit être considérée comme un antiseptique énergique. En solution, une dose de 1 p. 5000 empêcherait tout développement pour le *Bacille du charbon*, le *Bacille de la diphtérie*, le *Bacille pyocyanique*, le *Colibacille*, le *Bacille typhique*, le *Staphylocoque doré*. Pottevin (7) a démontré que des spores très résistantes, comme celles du *Bacillus subtilis*, sont tuées après un contact de quatre à six heures avec une solution à 10 p. 100, et en un jour à 15 p. 100 ; celles de *Bacillus anthracis*, moins résistantes, périssent après un contact de cinq à quinze minutes à 4 p. 100 et de un quart d'heure à une heure à 15 p. 100. La solution à 2 p. 1000 tue le *Bacille typhique*, le *Staphylocoque doré*,

(1) Boer, *Zeitschr. für Hygiene*, IX, 1890, p. 479.

(2) Vogado, O poder bactericida de alguns saes de mercurio. Thèse de Lisbonne, 1909.

(3) Behring, Ueber Quecksilbersublimat in eiweisshaltigen Flüssigkeiten (*Centralbl. für Bakt.*, III, 1888, p. 27, 64).

(4) Boer, *loc. cit.*

(5) Cernovodeanu et Henri, Action de l'argent colloïdal sur quelques microbes pathogènes (*Soc. de Biol.*, LXI, 1905).

(6) Sternberg, Report of Comittee on Desinfectants, 1885.

(7) Pottevin, Recherches sur le pouvoir antiseptique de l'aldéhyde formique (*Ann. de l'Inst. Pasteur*, VIII, 1894, p. 796).

le *Bacille pyocyanique* après un contact de quinze à vingt minutes. La solution à 1 p. 100 donne des résultats bien plus sûrs. La solution à 5 p. 100 tue les *Bacilles tuberculeux* des crachats après un contact d'une heure.

A l'état de vapeurs, son action est très rapide également. A la dose de 1 p. 100 dans l'air, la plupart des microbes, même bien résistants, périssent après un contact de quelques minutes. En proportion de 2gr,5 par mètre cube, on obtient les mêmes effets destructeurs, mais en prolongeant l'action pendant plusieurs heures. Toutefois, l'action des vapeurs paraît être toute superficielle et se limiter à une couche peu épaisse de la substance employée ; en présence d'un grand excès d'humidité, le pouvoir pénétrant augmente. D'après Spengler (1), le *Bacille tuberculeux* serait moins sensible que beaucoup d'autres espèces à l'action des vapeurs d'aldéhyde formique, ce qui pourrait permettre d'en obtenir des cultures directement avec des crachats tuberculeux où les microbes autres seraient tués par une action ménagée de ces vapeurs.

L'aldéhyde formique à 3 p. 100 détruit, après un contact de quelques heures, les toxines tétanique et diphtérique ; elle agit donc non seulement sur les microbes, mais encore sur leurs produits solubles.

On se sert de la solution aqueuse à 40 p. 100 du commerce, désignée sous le nom de *formaline* ou de *formol*, ou de l'aldéhyde formique gazeuse obtenue par chauffage de son polymère, le trioxyméthylène.

L'**eau oxygénée** arrête rapidement les fermentations et les putréfactions. D'après Miquel, elle empêche tout développement dans le bouillon à la dose de 1 p. 20000. A 1 p. 100, elle détruit en quelques minutes la plupart des Bactéries peu résistantes, le *Bacille typhique*, le *Spirille du choléra*, le *Staphylocoque doré*, le *Pneumocoque*. Les spores charbonneuses périssent en moins d'une heure dans une solution à 2 p. 100 et résistent quelques heures à la solution à 1 p. 100 (2). Pour Lucas-Championnière (3), l'eau oxygénée serait un antiseptique de choix dans la pratique chirurgicale.

L'**ozone** se rapproche comme action de l'eau oxygénée, d'après les recherches d'Ohlmüller (4), mais n'est réellement d'une activité suffisante que sur les Bactéries en suspension dans de l'eau ; sec, il serait presque sans action. D'après Sonntag (5), une atmosphère renfermant 3 milligrammes d'ozone par litre est sans action sur les spores charbonneuses, qui ne sont tuées qu'avec 14 milligrammes et une exposition de vingt-quatre heures. Christmas (6) a vu que des cultures fraîches de *Bacille du charbon* étaient mortes après un séjour de quatre-vingt-

(1) Spengler, Tuberkelbacillenzüchtung aus Bacteriengemischen und Formaldehyddesinfektion (*Zeitschr. für Hygiene*, XLII, 1903, p. 90).

(2) Schilow, Ueber den Einfluss des Wasserstoffsuperoxydes auf einige pathogene Mikroorganismen (*St. Petersb. med. Woch.*, 1889, n° 6).

(3) Lucas-Championnière, Sur la valeur antiseptique de l'eau oxygénée (*Acad. de méd.*, 6 décembre 1898).

(4) Ohlmüller, Ueber die Einwirkung des Ozons über Bakterien (*Arb. aus d. Kaiserl. Gesundheitsamte*, VIII, 1893, p. 228).

(5) Sonntag, Ueber die Bedeutung des Ozons als Desinficiens (*Zeitschr. für Hygiene*, VIII, 1890).

(6) Christmas, Sur la valeur antiseptique de l'ozone (*Ann. de l'Inst. Pasteur*, VII, 1893, p. 776).

seize heures dans une atmosphère chargée de 1mgr,5 à 2 milligrammes par litre d'ozone; après quarante-huit heures, leur développement se faisait encore, mais très ralenti; un séjour de vingt-quatre heures n'avait aucun effet notable (Voy. aussi p. 83). L'ozone est utilisé pour la stérilisation des eaux d'alimentation, où il paraît donner de très bons résultats aux doses de 2, 4 ou 6 grammes par mètre cube. Seules des spores très résistantes, celles du type *Bacillus subtilis* par exemple, peuvent résister à son action.

L'*iode* a des propriétés bactéricides marquées. Miquel dit qu'il empêche tout développement dans le bouillon à la dose de 1 p. 4 000. Podgorny (1) a observé qu'en solution il tuait le *Bacille du charbon* en proportion de 1 p. 1 500, le *Bacille de la diphtérie* à 1 p. 1 350, le *Colibacille* à 1 p. 1 200, le *Bacille typhique* à 1 p. 600, le *Spirille du choléra* à 1 p. 360, le *Bacille du charbon* à 1 p. 900, après un contact de cinq à trente minutes. Sternberg a vu le *Pneumocoque* tué après deux heures de contact avec la solution à 1 p. 1 000. La solution à 1 p. 500 tue le *Bacille de la tuberculose* en moins d'un jour. Freudenreich (2) a vu les vapeurs d'iode tuer en moins de quarante-huit heures à 30°-35° les cultures de charbon, de tuberculose et de choléra.

Kérassotis (3) a étudié dans mon laboratoire l'action de l'iode sur une série d'espèces. Les résultats de ses observations sont résumés dans les tableaux suivants. Il y a lieu de remarquer avant tout que l'iode se combine facilement avec les albuminoïdes, surtout avec les peptones, pour former des iodo-albuminates ou iodo-peptonates à pouvoir antiseptique très faible. Par exemple, 10 centimètres cubes de bouillon peptonisé à 2 p. 100 fixent 0gr,07 d'iode. Il est nécessaire de tenir compte de cet iode fixé, l'iode en excès étant seul véritablement actif. En employant des milieux minéraux, on élimine cette cause d'affaiblissement. D'un autre côté, la petite quantité d'iodure de potassium, employée pour dissoudre l'iode, n'a que des effets tout à fait négligeables.

PROPORTION LIMITE D'IODE PERMETTANT LE DÉVELOPPEMENT.

	En milieu peptonisé.	En milieu minéral.
Bacille pyocyanique	1 p. 166	1 p. 20 000 (liq. Arnaud et Charrin).
Bacille typhique	1 p. 66	1 p. 75 300 (liq. d'Ouchinsky).
Colibacille	1 p. 166	1 p. 67 380 Id.
Bacille du charbon	1 p. 312	1 p. 75 300 (liq. Arnaud et Charrin).
Vibrion du choléra	1 p. 333	1 p. 40 000 Id.
Staphylocoque doré	1 p. 333	Ne se développe pas.

PROPORTION D'IODE TUANT LE MICROBE A 35° DANS L'ESPACE DE TEMPS DE :

	30 minutes.	20 minutes.	10 minutes.	5 minutes.
Bacille pyocyanique	1 p. 13 333	1 p. 12 300	1 p. 10 000	1 p. 8 000
Bacille typhique	1 p. 40 000	1 p. 32 000	1 p. 20 000	1 p. 17 777
Colibacille	1 p. 40 000	1 p. 32 000	1 p. 20 000	1 p. 17 777
Bacille du charbon	1 p. 20 000	1 p. 17 777	1 p. 12 300	1 p. 10 000
Vibrion du choléra	1 p. 17 777	1 p. 13 333	1 p. 10 000	1 p. 8 000
Staphylocoque doré	1 p. 17 777	1 p. 12 300	1 p. 8 000	1 p. 6 666

(1) PODGORNY, De l'action de l'iode sur les microbes pathogènes. Thèse de Saint-Pétersbourg, 1897.

(2) FREUDENREICH, De l'action antiseptique de quelques essences (*Ann. de micr.*, I, 1889).

(3) KÉRASSOTIS, Recherches expérimentales sur le pouvoir antiseptique de l'iode. Thèse de Nancy, 1904.

Temps nécessaire pour tuer le microbe au contact des vapeurs d'iode.

	A l'état sec.	A l'état humide.		
	A 35°	A 5°.	A 16°.	A 35°.
Bacille pyocyanique.	Après 20 heures.	Après 12'1	Après 10'	Après 10'
Bacille typhique....	— 12 —	— 25'	— 25'	— 10'
Colibacille..........	— 18 —	— 25'	— 20'	— 10'
Bacille du charbon..	— 32 —	— 35'	— 20'	— 15'
Vibrion du choléra..	— 3 minutes.	— 5'	— 3'	Instantanément
Staphylocoque doré.	— 29 heures.	— 35'	— 25'	après 18'

Le *trichlorure d'iode* serait plus actif que l'iode.

Le **chlore** empêcherait tout développement dans le bouillon à 1 p. 15 000 d'après Jalan de la Croix (1), à 1 p. 4 000 d'après Miquel. D'après Geppert (2), les spores charbonneuses sont très rapidement tuées par la solution à 1 p. 500. Les vapeurs sèches de chlore n'ont que des effets peu marqués. Les vapeurs humides sont très énergiques; Miquel a vu périr tous les germes des poussières à la dose de 4 à 5 grammes par mètre cube; Fischer et Proskauer (3) ont trouvé que le *Bacille du choléra des poules* et le *Streptocoque pyogène* étaient tués en vingt-quatre heures par les vapeurs humides de chlore à 1 p. 25 000 et les spores charbonneuses à 1 p. 2 500.

Le **brome** infertiliserait les bouillons à 1 p. 1 700 d'après Miquel. D'après Schumburg (4), il suffirait de 6 centigrammes de brome pour stériliser 1 litre d'eau riche en microbes.

L'**acide phénique** est un antiseptique très estimé et digne de l'être, bien que son action soit parfois inconstante.

D'après Miquel, l'acide phénique empêche tout développement dans le bouillon à la dose de 1 p. 330. On est obligé de reconnaître qu'il y a à ce propos de grandes différences suivant l'espèce microbienne que l'on considère; l'histoire du *Bacille typhique* et du *Colibacille* en fournira la preuve. De tels chiffres ne peuvent donc être regardés que comme très relatifs.

Koch a reconnu que les spores charbonneuses étaient respectées par la solution à 1 p. 100; elles étaient tuées en sept jours avec la solution à 2. p. 100 et en quarante-huit heures avec celle à 3 p. 100. Davaine a vu le *Bacille du charbon* sans spores mourir après une heure de contact avec la solution à 1 p. 100.

D'après Sternberg, le *Pneumocoque* est tué en deux heures par la solution à 1 p. 200 et le *Staphylocoque doré* par celle à 1 p. 125. Arloing, Cornevin et Thomas (5) disent que la solution à 2 p. 100 détruit en huit heures le virus frais du charbon symptomatique et en une vingtaine d'heures seulement le virus desséché. D'après Nicati et Rietsch (6), la solution à 1 p. 200 tue le *Spirille du choléra* en dix minutes. Boer a vu mourir le *Bacille du charbon*, le *Bacille de la diphtérie*, le *Bacille*

(1) Jalan de la Croix, Das Verhalten der Bacterien des Fleischwassers gegen einige Antiseptica (*Arch. für exp. Pathol.*, XIII, 1881, p. 175).

(2) Geppert, Zur Lehre von den Antisepsis (*Berl. klin. Wochenschr.*, 1889).

(3) Fischer et Proskauer, *Mittheil. aus. dem Kaiserl. Gesundheitsamte*, 1884, II, p. 228).

(4) Schumburg, Ein neues Verfahren zur Herstellung keimfreien Trinkwassers (*Deutsche med. Wochenschr.*, 1897, n° 10).

(5) Arloing, Cornevin et Thomas, Le charbon symptomatique du bœuf, 1887, p. 1825.

(6) Nicati et Rietsch, Recherches sur le choléra (*Arch. de physiol.*, 1885).

de la morve à 1 p. 300, le *Bacille typhique* à 1 p. 200. Yersin a détruit la virulence du *Bacille tuberculeux* des cultures avec la solution à 5 p. 100 après un contact de trente secondes et avec celle à 1 p. 100 après un contact d'une minute.

D'après Nocht (1), la solution à 5 p. 100 respecterait plusieurs jours, à la température ordinaire, les spores charbonneuses, qui seraient tuées après trois heures de contact à la température de 36°,5. D'une façon générale, on peut dire qu'une température un peu élevée exalte l'activité des antiseptiques.

Les solutions alcooliques d'acide phénique paraissent être beaucoup moins actives que les solutions aqueuses (Koch).

Les **crésols**, les **créolines** et produits similaires paraissent agir comme l'acide phénique (2).

Le **thymol** paraît un peu moins actif à certains expérimentateurs ; d'autres le préfèrent même à l'acide phénique.

L'**acide borique** ne paraît avoir que des propriétés antiseptiques faibles ; la solution à 4 p. 100 ne tue les microbes peu résistants qu'après un contact prolongé et respecte les spores. Il en est de même du borate de soude.

Le **sulfate de cuivre** empêche le développement dans les bouillons à 1 p. 1 100. A 5 p. 100, il tue en une à deux heures le *Bacille typhique*, le *Spirille du choléra*, le *Staphylocoque pyogène*, le *Streptocoque pyogène*, mais est sans action sur les spores.

Le **sulfate de fer** à 10 p. 100 paraît encore moins actif que le précédent.

Le **chlorure de zinc** à 5 p. 100, d'après Sternberg, tue les germes peu résistants en quelques heures, mais respecte les spores charbonneuses.

Le **permanganate de potasse** à 5 p. 100 tue les spores charbonneuses en un jour, d'après Koch, et le *Bacille de la morve* en quelques minutes, d'après Lœffler (3). Jaeger (4) dit que cette solution est mortelle pour beaucoup de microbes pathogènes, mais que le *Bacille de la tuberculose* résiste. D'après Gardner et King (5), le *Bacille typhique* serait tué avec la proportion de 0gr,175 de permanganate par litre.

L'**alcool** n'a qu'une action faible et incertaine. Les recherches de Minervini (6) et de Bertarelli (7) montrent que les espèces délicates seules succombent à une courte immersion dans le liquide ; les résistantes supportent un contact prolongé. Les coagulations qui se produisent avec les solutions de titre fort peuvent protéger contre l'action du réactif. D'après Igersheimer (8), l'alcool à 60° tue très rapidement en une minute

(1) Nocht, *Zeitschr. für Hygiene*, VII, 1890, p. 521.

(2) Seybold, *Zeitschr. für Hygiene*, XXIX, 1898, p. 377.

(3) Loeffler, Die Aetiologie der Rotzkrankheit (*Arb. aus dem Kaiserl. Gesundheitsamte*, I, 1886, p. 41).

(4) Jaeger, Untersuchungen über die Wirksamkeit verschiedener chemische Desinfektionsmittel bei kurz dauernder Einwirkung auf Infektionsstoffe (*Arb. aus dem Kaiserl. Gesundheitsamte*, V, 1889, p. 247).

(5) Gardner et King, The germical action of potassium permanganate (*Amer. Chem. Journ.*, 1906, XXXV, p. 144).

(6) Minervini, Ueber die bakterieide Wirkung des Alkohols (*Zeitschr. für Hygiene* XXIX, 1898, p. 117).

(7) Bertarelli, Sul potere battericida del alcool etilico (*Il Policlinico*, VII, 1900).

(8) Igersheimer, Ueber die bacterizide Kraft des 60 proz. Aethylalkohols (*Centralbl. für Bakt.*, 1 Abth., Originale, XL, 1906, p. 414).

le *Staphylocoque doré*, le *Bacille typhique*, le *Colibacille*, le *Bacille diphtérique*, le *Bacille pyocyanique*; aussi vante-t-il beaucoup ce liquide pour la désinfection des mains.

Les solutions dans l'eau sont naturellement moins actives. D'après Stokvis (1), le *Bacille typhique* se développe encore bien avec 6 p. 100 d'alcool et n'est arrêté qu'avec 8 p. 100, encore sans être tué. Sabrazès et Mercandier (2) disent qu'il périt en dix heures dans du vin à 9 p. 100 d'alcool.

Les **anesthésiques**, chloroforme ou éther, n'ont pas sur les microbes d'action bien énergique. L'activité vitale est ralentie et, par suite, ses manifestations; mais de hautes doses n'arrivent pas à la suspendre complètement chez les espèces assez résistantes. Jalan de la Croix n'a pas réussi à rendre stériles des bouillons additionnés de fortes proportions de chloroforme. Cependant, des espèces très sensibles, le *Streptocoque pyogène* et le *Spirille du choléra* par exemple, sont facilement tuées dans ces conditions.

Pour avoir une idée de la valeur antiseptique des substances ordinairement employées, le tableau suivant, dressé par Miquel (3), pourra rendre quelques services, tout en faisant de grandes réserves pour les applications de la pratique :

Tableau indiquant la plus petite quantité de substance antiseptique nécessaire pour empêcher la putréfaction d'un litre de bouillon de bœuf neutralisé, puis exposé à l'air.

1° SUBSTANCES ÉMINEMMENT ANTISEPTIQUES.

	grammes.		grammes.
Biiodure de mercure	0,025	Bichlorure de mercure	0,07
Iodure d'argent	0,030	Nitrate d'argent	0,08
Eau oxygénée	0,050		

2° SUBSTANCES TRÈS FORTEMENT ANTISEPTIQUES.

	grammes.		grammes.
Acide osmique	0,15	Iodure de cadmium	0,50
Acide chromique	0,20	Brome	0,60
Chlore	0,25	Iodoforme	0,70
Iode	0,25	Chlorure de cuivre	0,70
Chlorure d'or	0,25	Chloroforme	0,70
Bichlorure de platine	0,30	Sulfate de cuivre	0,90
Acide cyanhydrique	0,40		

3° SUBSTANCES FORTEMENT ANTISEPTIQUES.

	grammes.		grammes
Acide salicylique	1,00	Acide chlorhydrique	2 à 3,00
Acide benzoïque	1,10	— phosphorique	2 à 3,00
Cyanure de potassium	1,20	Essence d'amandes amères	3,00
Bichromate de potasse	1,20	Acide phénique	3,20
Acide picrique	1,50	Permanganate de potasse	3,50
Gaz ammoniac	1,60	Alun	4,50
Chlorure de zinc	1,90	Tannin	4,80
Acide thymique	2,00	Acide oxalique	3 à 5,00
Sulfate de nickel	2,50	— tartrique	3 à 5,00
Nitrobenzine	2,60	— citrique	3 à 5,00
Acide sulfurique	2 à 3,00	Sulfhydrate alcalin	5,00
— azotique	2 à 3,00		

(1) STOKVIS, Alkohole und Essigsaüre toleranz bei Bakterien (*Centralbl. für Bakt.*, 1, Abth., Originale, LXVIII, 1908, p. 436).

(2) SABRAZÈS et MERCANDIER, Action du vin sur le Bacille d'Eberth (*Ann. de l'Inst. Pasteur*, XXI, 1907, p. 312).

(3) MIQUEL, Les organismes vivants de l'atmosphère. Thèse de Paris. 1882.

4° SUBSTANCES MODÉRÉMENT ANTISEPTIQUES.

	grammes.		grammes.
Bromhydrate de quinine	5,50	Chloral	9,30
Acide arsénieux	6,00	Salicylate de soude	10,00
Sulfate de strychnine	7,00	Sulfate de protoxyde de fer	11,00
Acide borique	7,50	Soude caustique	18,00

5° SUBSTANCES FAIBLEMENT ANTISEPTIQUES.

	grammes.		grammes.
Éther sulfurique	22,00	Chlorhydrate de morphine	75,00
Chlorure de calcium	40,00	Alcool éthylique	95,00
Borax	70,00	Chlorure de baryum	95,00

6° SUBSTANCES TRÈS FAIBLEMENT ANTISEPTIQUES.

	grammes.		grammes.
Chlorhydrate d'ammoniaque	115,00	Bromure de potassium	240,00
Iodure de potassium	140,00	Sulfate d'ammoniaque	250,00
Chlorure de sodium	165,00	Hyposulfite de soude	275,00
Glycérine	225,00		

Ces déterminations indiquent la *puissance antiseptique* des substances employées; il en faut distinguer la *puissance bactéricide*, qui se mesure par le contact nécessaire pour *tuer* les germes microbiens. Les deux propriétés sont loin d'aller toujours de pair, comme le démontrent bien les données qui viennent d'être citées.

2° Agents physiques.

Température. — Il existe, pour les Bactéries, une limite inférieure de température au-dessous de laquelle toute multiplication végétative s'arrête; c'est le minimum de température pour la vie de l'espèce. Passé cette limite, la vie cesse de se manifester, la mort peut survenir.

Les Bactéries semblent pouvoir supporter sans périr un *froid* très intense. Von Frisch (1) a pu abaisser la température d'un liquide, où plusieurs espèces pullulaient et avaient formé des spores, jusqu'à — 110° sans les tuer, en prenant la précaution de ne revenir que peu à peu à la température ordinaire. Pasteur (2) avait annoncé depuis longtemps qu'elles résistaient à un froid de — 30°. Le degré de résistance semble varier suivant l'espèce. En effet, tandis que Gibier (3) a maintenu des cultures de *Bacillus anthracis* et de *Bacillus septicus* à — 45° pendant cinq heures sans leur faire perdre leur virulence, il a remarqué que le *Micrococcus du choléra des poules* ne résistait jamais à une température de — 35°; le virus rabique, qui renferme probablement des microbes pathogènes, s'atténue vers — 40°. Des expériences de Pictet et Yung (4) fournissent des résultats plus précis. A l'aide de procédés spéciaux, ils ont soumis des espèces bien déterminées à des températures très basses, maintenues pendant un temps assez long. Après avoir fait agir un froid de — 70° pendant cent huit heures et un de — 130°

(1) VON FRISCH, Ueber den Einfluss niederer Temperaturen auf die Lebensfähigkeit der Bacterien (*Sitzungsber. der Wiener Acad. der Wissensch.*, mai 1877).

(2) PASTEUR, Expériences relatives à la génération spontanée, 1861.

(3) GIBIER, cité *in* DUCLAUX, Chimie biologique, p. 822.

(4) PICTET et YUNG, De l'action du froid sur les microbes (*C. R. de l'Acad. des sc.* XCVIII, 1884, p. 747).

pendant vingt heures, ils ont observé les résultats suivants. Une culture de *Bacillus anthracis*, ne renfermant que des spores, garde toute sa virulence; par contre, du sang charbonneux devient tout à fait inoffensif. Le *Bacillus Chauvæi*, du *charbon symptomatique*, conserve tout son pouvoir pathogène. Des cultures de *Bacillus subtilis* et de *Bacillus ulna* ne perdent rien de leur vitalité. Dans des colonies de *Micrococcus luteus* et d'un *Micrococcus blanc*, la plupart des éléments sont morts; un certain nombre toutefois ont résisté. De la lymphe vaccinale prise sur un veau et soumise aux mêmes actions a donné quand même, après inoculation, des pustules caractéristiques. Du reste, des graines, des œufs d'Invertébrés, soumis au même traitement, conservent également toute leur vitalité. Des recherches plus récentes de Pictet (1) montrent que des cultures de Bactéries, dont beaucoup avaient des spores, ont résisté à un froid de — 200°, obtenu avec l'air liquéfié; à ce degré de froid, la virulence des cultures serait cependant toujours détruite.

D'Arsonval et Charrin (2), expérimentant sur le *Bacille pyocyanique*, ont remarqué que ce microbe résistait bien à des froids de — 40°, — 60°, — 95°, obtenus avec le cryogène Cailletet, mais se montrait alors modifié dans sa forme et certains caractères de culture. Ils ont obtenu les mêmes résultats avec des températures plus basses, vers — 270°, en opérant avec l'air liquide.

Les recherches de Ravenel (3), de Macfadyen (4), de Meyer (5), de Belli (6) montrent que l'air liquide, c'est-à-dire un froid pouvant atteindre — 220°, n'a qu'une action très minime ou pas d'effet sensible sur la vitalité et la virulence de beaucoup d'espèces microbiennes.

La plupart des espèces résistent très bien aux froids modérés. Ici, les expériences sont plus précises; il est d'un haut intérêt pour l'hygiéniste, en effet, de savoir en quoi il peut compter sur les circonstances naturelles pour combattre l'apparition de certaines espèces dangereuses pour l'homme. Or, il a été prouvé que des températures peu inférieures à zéro degré n'avaient que très peu d'effet sur les Bactéries; l'analyse bactériologique d'échantillons de glace y a révélé la présence d'un grand nombre de Bactéries, lorsque la glace provenait d'eaux impures. La glace peut donc transmettre des germes pathogènes, tout comme l'eau dont elle provient. Certaines espèces semblent disparaître peu à peu, d'autres supporter la congélation pendant un temps très long. Mittchell (7) a remarqué que le *Micrococcus pyogenes aureus* et le *Bacillus typhosus* résistaient parfaitement à cent trois jours de congélation. Par contre, le *Micrococcus prodigiosus* et le *Proteus vulgaris* disparaîtraient après cinq jours de congélation. La conclusion à tirer de ces observations et

(1) Pictet, Des basses températures en biologie (*Arch. des sc. phys. et nat. de Genève*, 1893).

(2) D'Arsonval et Charrin, Influence des agents cosmiques sur l'évolution de la cellule bactérienne (*Arch. de physiol.*, 1894, p. 335). — Et : Action de l'air liquide sur les êtres monocellulaires ou leurs sécrétions (*Soc. de biol.*, 9 juill. 1898).

(3) Ravenel, The resistance of Bacteria to Cold (*The medical News*, 10 juin 1899).

(4) Macfadyen, *The Lancet*, 1900, p. 847 et 1130.

(5) Meyer, Ueber Einwirkung flussiger Luft auf Bakterien (*Centralbl. für Bakt.*, 1 Abth., XXVIII, 1900, p. 594).

(6) Belli, *Riforma medica*, 25 janvier 1902.

(7) Mitchell, *The med. Records*, 1887.

des recherches de Fraenkel (1) et de Prudden (2) est qu'une congélation, même prolongée, ne tue pas la plupart des Bactéries, mais ne fait qu'enrayer leur développement, qui reprend aussitôt que le froid a disparu. Cependant les expériences de Smith et Swingle (3) montrent qu'il y a une destruction de Bactéries même à des froids modérés, — 17° par exemple. Il existerait une température critique, voisine de zéro degré; les microbes résistant à ce froid résisteraient à des températures très basses, peut-être aux extrêmes. Les alternances de congélation et de dégel sont d'ordinaire rapidement fatales.

Les spores résistent généralement au froid.

Klepzoff (4), expérimentant sur le *Bacille du charbon*, dit avoir observé une diminution très nette de virulence à la suite d'exposition assez prolongée à des froids d'intensité moyenne, de — 20° à — 25° par exemple. Après sept jours d'exposition au froid, un virus très actif, occasionnant la mort du lapin en trois jours et demi, ne tue déjà plus le lapin qu'en cent quatre heures: en cent vingt heures après douze jours; après vingt-quatre jours, le lapin résiste à l'inoculation. Le virus employé ne contenait très probablement pas de spores.

La température la plus basse à laquelle les Bactéries peuvent commencer à végéter, leur *minimum* de température, paraît être très variable suivant l'espèce que l'on considère. D'après Forster (5) et Schmidt-Nielsen (6), certaines Bactéries de l'eau pourraient déjà végéter à zéro degré; Fischer (7) l'a reconnu aussi pour un *Bacille phosphorescent* trouvé sur des poissons morts dans la mer du Nord.

C'est en général, toutefois, à des températures un peu supérieures que se place le début de la végétation de la plupart des espèces. La grande majorité des Bactéries saprophytes de l'air ou des eaux ne commencent à croître que de 5° à 10°. D'après Seitz (8), le développement du *Bacille typhique* est déjà sensible à 4°.

D'autres espèces ont leur minimum de température de croissance reporté beaucoup plus haut. Ce sont d'abord des espèces pathogènes qui s'attaquent aux organismes présentant une température constante élevée; ainsi, le *Pneumocoque* ne se développe guère dans les milieux artificiels que de 20° à 23°, le *Bacille de la tuberculose* ne commence à s'y cultiver qu'à partir de 28°. Le *Bacillus thermophilus*, très intéressante espèce que Miquel a isolée de l'eau, ne se développe, dans les bouillons et la gélose, qu'au-dessus de 40°; c'est là, il faut le dire, un fait spécial à peu d'espèces.

A partir du minimum de température, si l'on va en remontant vers les degrés élevés, l'espèce continue à vivre jusqu'à une température supé-

(1) Fraenkel, Ueber der Bakteriengehalt der Eises (*Zeitschr. für Hygiene*, I, 2e p., p. 302).

(2) Prudden, Sur les Bactéries de la glace (*New York med. Records*, 1887), analysé dans *Ann. de l'Inst. Pasteur*, 1887, I, p. 400.

(3) Smith et Swingle, *Journ. of infect. diseases*, 1905.

(4) Klepzoff, Zur Frage über den Einfluss niederer Temperaturen auf die vegetativen Formen der Bacillus anthracis (*Centralbl. für Bakt.*, XVII, 1895, p. 289).

(5) Forster, Ueber die Entwickelung von Bakterien bei niederen Temperaturen (*Centralbl. für Bakt.*, 1892, XII, p. 431).

(6) Schmidt-Nielsen, Ueber einige psychrophile Mikroorganismen (*Centralbl. für Bakt.*, 2te Abth., IX, 1902, p. 145).

(7) Fischer, Bakteriologische Untersuchungen (*Zeitschr. für Hygiene*, I, 1886; II, 1887).

(8) Seitz, Bakteriologische Studien zur Typhusaetiologie. Leipzig, 1836.

rieure où toute multiplication cesse. C'est le *maximum* de température de l'espèce ; au-dessus, toute manifestation vitale disparaît, la mort arrive.

Cette limite supérieure paraît en général moins variable que le minimum. Elle se tient d'ordinaire aux environs du degré de chaleur qui paralyse et tue d'ordinaire le protoplasme vivant, vers 42°. C'est à cette température que s'arrête la végétation de nombreuses espèces saprophytes et d'un certain nombre d'espèces pathogènes, le *Pneumocoque* et le *Bacille de la tuberculose*, par exemple. D'autres ont leur maximum plus bas; le *Bacillus rosaceus metalloides*, très belle espèce à pigment rouge-carmin, ne croît plus au-dessus de 35° ; le *Bacille phosphorescent* de Fischer, cité plus haut comme végétant déjà à zéro degré, périt rapidement à 37°. Quelques-unes l'ont plus haut : le *Bacille du charbon* ne cesse de végéter qu'à 45° ; le *Bacille typhique* et le *Bacille du côlon* n'arrêtent leur multiplication qu'à 46°. Les *Bacilles thermophiles* croissent encore bien à 70° et ne périssent qu'à 72°-77°, comme on le verra ci-après.

Entre ces deux stades, il est un point où la vie se manifeste avec la plus grande énergie, où la multiplication donne tout ce qu'elle peut donner, et où les fonctions particulières aux espèces s'accomplissent avec la plus grande intensité; c'est l'*optimum* de température de l'espèce.

Cet optimum est, cela se comprend, en relation directe avec le minimum et le maximum, plus cependant avec le second dont il se rapproche toujours beaucoup. Il peut varier dans d'assez larges limites suivant l'espèce à laquelle on s'adresse. Le *Bacille phosphorescent* de Fischer a son optimum entre 5° et 10°, le *Bacillus rosaceus metalloides* à 15° ; chez le *Bacille typhique*, il se trouve entre 25° et 30°; chez le *Pneumocoque* à 35° ; chez le *Bacille de la tuberculose* à 38° ; chez le *Bacille thermophile* de Miquel, il est placé entre 65° et 70°. D'après Brefeld (1), le développement du *Bacillus subtilis* se fait de 6° à 50°, avec un optimum vers 30°. Le *Bacillus anthracis* commence à se multiplier par division à 15°, il le fait jusqu'à 43° et présente un optimum de croissance de 20° à 25°. Il est, en général, assez difficile de fixer d'une manière précise ce point optimum ; on ne peut, en effet, se baser, pour le faire, que sur l'intensité apparente de la croissance dans les cultures, épaisseur de la culture, trouble plus ou moins prononcé dans les bouillons, caractères qui peuvent largement dépendre de la vitalité de la race que l'on observe. On voit, en somme, qu'entre les limites extrêmes il est des températures favorables pour la végétation du microbe, des températures *eugénésiques* ; d'autres, au contraire, défavorables, où il continue à végéter, mais mal, péniblement, des températures *dysgénésiques*.

Ces rapports de températures varient dans de larges limites suivant les espèces ; ils doivent aussi varier, quoique dans des limites plus restreintes, suivant le milieu pour une même espèce. C'est ce qui semble résulter de l'intéressante remarque de Koch, que le *Bacille de la tuberculose* a, chez les animaux à sang chaud, un minimum et un optimum de température plus élevés que dans les cultures.

En général, une température de 60° environ suffit pour tuer les cellules végétatives. Pasteur a montré qu'en chauffant le vin vers 50° à 60° on tue tous les germes des fermentations acétique, muqueuse et amère ;

(1) Brefeld, Untersuchungen über die Spaltpilze, *Bacillus subtilis*, 1878.

c'est un excellent moyen pour conserver les vins sujets à ces altérations et le principe de la *pasteurisation*. Cette limite peut cependant être dépassée ; certaines espèces semblent pouvoir prospérer à une température supérieure. Van Tieghem (1) a décrit le premier deux espèces qu'il est possible de cultiver à 74°, en prenant la précaution de les faire vivre dans un milieu parfaitement neutre ou légèrement alcalin, la moindre trace d'acide arrêtant le développement. L'une est un *Micrococcus* en longs chapelets, l'autre un *Bacille* dont le maximum de végétation est à 77°; les caractères donnés ne suffisent malheureusement pas pour les reconnaître.

Le *Bacillus thermophilus* de Miquel (2) présente la curieuse propriété de supporter sans périr, à l'état de cellules végétatives, une température de 71° et de se développer abondamment encore à 70° et un peu au-dessus, à un degré de chaleur où les éléments vivants périssent d'ordinaire. Globig (3) a, de son côté, décrit une Bactérie, *Bacillus mesentericus ruber*, pouvant croître aussi entre 50° et 70°. Rabinowitch (4) et d'autres ont, depuis, signalé un assez grand nombre de ces *Bactéries thermophiles*. Russell et Hastings (5) ont isolé d'un lait pasteurisé un *Micrococcus* qui se cultive encore à 76° (Voy., à la description, *Bacilles thermophiles*).

La présence de plusieurs espèces de Bactéries dans l'eau des sources thermales à leurs points d'émergence profonde, aux griffons, où la température atteint et dépasse même les degrés cités, doit faire reculer encore plus loin la limite de la vie végétative chez ces êtres.

Mais si de tels degrés de chaleur tuent les cellules végétatives, il n'en est pas de même des spores, qui résistent à des températures bien plus élevées.

Brefeld (6) a pu faire germer des spores de *Bacillus subtilis* qui avaient été portées à 100° pendant une heure ; elles n'étaient toutes mortes qu'après trois heures d'ébullition. A 105°, il faut quinze minutes pour les tuer, dix à 107° et cinq à 110°.

D'après Roux (7), les spores du *Bacille du charbon* supportent pendant dix minutes une température de 95°, dans un milieu humide ; à 100°, elles meurent en moins de cinq minutes. On peut les chauffer longtemps à 80° sans les faire périr. Les spores résistent plus encore à une chaleur sèche. Koch (8) a observé la germination de spores de *Bacillus subtilis* et de *Bacillus anthracis* portées à 123° dans l'air sec. D'après Arloing, Cornevin et Thomas (9), les spores du *Bacille du char-*

(1) Van Tieghem, Sur les Bactériacées vivant à la température de 74° C. (*Bull. de la Soc. Bot.*, t. XXVIII, 1881, p. 35).

(2) Miquel, *Annuaire de Montsouris*, 1881, p. 464, et Monographie d'un Bacille vivant au delà de 70° C. (*Ann. de micr.*, I, 1888).

(3) Globig, Ueber Bacterien-Wachsthum bis 50°-70° (*Zeitschr. für Hygiene*, III, 1888).

(4) Lydia Rabinowitch, Ueber die thermophilen Bakterien (*Zeitschr. für Hygiene*, 1895, XX, p. 154).

(5) Russell et Hastings, A Micrococcus, the thermal death limit of which is 76° C. (*Centralbl. für Bakt.*, 2te Abth., VIII, 1902, p. 339).

(6) Brefeld, *loc. cit.*

(7) Roux, De l'action de la chaleur et de l'air sur les spores de la Bactéridie du charbon (*Ann. de l'Inst. Pasteur*, 1887, I, p. 392).

(8) Koch, Untersuchungen über Bacterien (*Cohn's Beitr. zur Biol. der Pflanzen*, I).

(9) Arloing, Cornevin et Thomas, *C. R. de l'Acad. des sc.*, XCIV, 1882, p. 189.

bon symptomatique, prises dans le sang, ne résistent pas plus de deux minutes dans l'eau bouillante ; desséchées préalablement à 33°, il faut une ébullition de deux heures pour les détruire. Miquel (1) a pu porter des germes à 110°, 120°, 130°, et même 145°, dans l'air sec : certains ont encore rajeuni ; à 150°, il a toujours obtenu une stérilisation absolue ; dans les mêmes conditions, Cambier (2) dit n'avoir pas obtenu la stérilisation de terre de jardin, desséchée à l'avance, après un chauffage de trente-cinq minutes à 180°.

La résistance à la chaleur sèche ou humide paraît beaucoup dépendre des conditions dans lesquelles se trouvent les germes au moment où ils sont exposés à l'action de la température.

Des expériences très complètes à ce point de vue ont été faites par Duclaux (3) sur les Bactéries occasionnant la fermentation de diverses matières albuminoïdes, en particulier de la caséine du lait, qu'il range sous la rubrique générique de *Tyrothrix*.

Les cellules très jeunes du *Tyrothrix tenuis* ne périraient qu'entre 90° et 95° dans un liquide neutre, et seulement au-dessus de 100° dans un liquide légèrement alcalin. Les spores sont encore vivantes après avoir été portées à 115° dans un liquide alcalin. Le développement est plus rapide de 25° à 35°.

Le *Tyrothrix filiformis* meurt à 100° dans un liquide légèrement acide, et seulement au-dessus dans le lait. Les spores périssent à 110° quand elles proviennent de cultures sur gélatine et seulement à 120° quand elles viennent du lait.

Le *Tyrothrix turgidus*, à l'état de bâtonnet, périt à 80° ; ses spores ne sont tuées qu'à 115°.

La réaction du milieu influe considérablement, on le voit, sur le degré de résistance à la chaleur ; l'acidité nuit ici à la conservation de la vitalité, comme elle nuit, en d'autres circonstances, à la germination des spores, à la multiplication végétative et à l'accomplissement de la fonction de ferment. Dans le lait, en particulier, la résistance des microbes en général paraît être favorisée par la nature et la réaction du milieu. Cependant, des expériences précises de Rosenau (4) montrent que, dans le lait, le *Bacille tuberculeux* perd toute virulence après un chauffage de vingt minutes à 60°, et un beaucoup plus court à 65° ; le *Bacille typhique* y meurt en deux minutes à 60°, ainsi que le *Bacille de la diphtérie*, le *Vibrion du choléra*, le *Micrococcus melitensis* ; le *Bacille dysentérique* peut résister à un chauffage de cinq minutes à 60°, mais est sûrement tué après dix minutes.

Miquel et Lattraye (5) ont démontré, en des expériences très précises, que les spores du *Bacillus subtilis* et d'autres espèces à caractères voisins peuvent résister très longtemps à une température humide de 100° qui ne les tue souvent qu'après cinq heures d'action. Pour ces

(1) Miquel, Les organismes vivants de l'atmosphère. Thèse de Paris, 1882.

(2) Cambier, Résistances des germes bactériens à la chaleur sèche (*Ann. de micr.*, 1896).

(3) Duclaux, Le lait. Paris, J.-B. Baillière, 1887, et Chimie biologique, p. 649 et suiv.

(4) Rosenau, The thermal death points of pathogenic microorganisms in milk (*Hyg. Lab. public Health of in U. S. Bull. n° 42*. Washington, 1908).

(5) Miquel et Lattraye, De la résistance des spores des Bactéries aux températures humides égales et supérieures à 100° (*Ann. de micr.*, 1875, VII).

derniers expérimentateurs, une légère alcalinité des milieux diminuerait la résistance des germes, les milieux neutres lui étant plus favorables. Les résultats obtenus par Wroblewsky (1), avec le *Bacillus mesentericus vulgatus*, ne font que confirmer les précédents. Morax et Marie (2) ont vu les spores du *Bacille du tétanos* supporter sans périr 120° à sec pendant trois heures et celles du *Bacillus subtilis* résister à 155° pendant vingt minutes dans les mêmes conditions.

Les différences des conditions dans lesquelles se sont faites les expériences établies sur ce point font que les résultats énoncés ne sont pas toujours concordants; une même espèce, en effet, peut, suivant son état biologique, résister plus ou moins aux causes de destruction, et particulièrement à la chaleur. En tenant compte de ces restrictions, le tableau suivant peut être instructif à ce point de vue; il indique, pour un certain nombre d'espèces, le degré de température mortel après un temps déterminé d'exposition; sauf exceptions mentionnées, c'est la chaleur humide qui a été employée.

Streptocoque pyogène.......	52°	après 10 minutes.	(Sternberg) (3).
Staphylocoque doré.........	58°	— 10 —	(Sternberg).
— —	70°	— 5 —	(Sternberg).
— —	80°	— 1 minute 1/2	(Sternberg).
Pneumocoque................	56°	— 10 minutes.	(Sternberg).
Gonocoque..................	55°	quelques minutes.	
Spirille du choléra...........	60°	après 10 minutes.	(Kitasato).
— —	59°	— 1 minute.	(Van Genus) (4).
— —	54°	— 5 minutes.	(Van Genus).
— —	52°	— 4 —	(Sternberg).
Spirille de Finckler.........	55°	— 1 minute.	(Van Genus).
— —	50°	— 5 minutes.	(Van Genus).
Bacille typhique.............	60°	— 20 —	(Pfuhl).
— —	60°	— 5 —	(Büchner).
— —	60°	— 1 minute.	(Van Genus).
— —	57°	— 5 minutes.	(Janowski).
— —	56°	— 10 —	(Sternberg).
— —	56°	— 5 —	(Van Genus).
Colibacille..................	80°	— 1 minute.	(Chantemesse et Widal).
—	62°,5	— 1 —	(Van Genus).
—	58°	— 5 minutes.	(Malvoz).
—	60°	— 10 —	(Weisser).
Bacille de la diarrhée verte...	100°	— 10 —	(Lesage).
— de la diphtérie........	60°	— 10 —	(Lœffler).
— —	58°	— 10 —	(Velch et Abbott).
— de la morve..........	55°	— 10 —	(Lœffler).
— —	61°	— 1 minute.	(Lœffler).
— de la tuberculose.....	70°	— 1 —	(Grancher et Ledoux-Lebard).
— —	70°	— 10 minutes.	(Yersin).
— —	68°-68°,5	— 20 —	(Ritter).
— —	65°	— 15 —	(Forster).
— —	60°	— 20 —	(Bonhoff).

(1) Wroblewsky, Verhalten des Bacillus mesentericus vulgatus bei höheren Temperaturen (*Centralbl. für Bakt.*, 2te Abth., I, p. 417).

(2) Morax et Marie, Action de la chaleur sèche sur les spores et la toxine tétanique (*Ann. de l'Inst. Pasteur*, XVI, 1902, p. 418).

(3) Sternberg, The thermal death point of pathogenic organismus (*The intern. Journ. of the med. sc.*, XCIV, 1887, p. 146).

(4) Van Genus, Ueber das Pasteurisiren von Bacterien (*Arch. für Hygiene*, IX, 1889,

Bacille de la tuberculose.....	60°	après 15 minutes.	(Schraeder).
— —	55°	— 4 heures.	(De Man) (1).
— —	60°	— 1 heure.	(De Man).
— —	65°	— 15 minutes.	(De Man).
— —	70°	— 10 —	(De Man).
— —	80°	— 5 —	(De Man).
— —	90°	— 2 —	(De Man).
— —	95°	— 1 minute.	(De Man).
Bacille du charbon (sans spores)..................	54°	— 10 minutes.	(Chauveau).
Bacille du charbon (sans spores)	86°	— 1 minute 1/2	(Chauveau).
Bacille du charbon (avec spores)....................	100°	— 10 minutes.	(Chauveau).
Bacille du charbon (avec spores)	95°	— 10 —	(Roux).
Bacille de la peste bubonique.	58°	— 1 heure.	(Wilm).
— — .	80°	— 20 minutes.	(Wilm).
— — .	100°	— 10 — .	(Wilm).
— — .	100°	— 1 minute.	(Abel).
— — .	90°	— 5 minutes.	(Abel).
— — .	70°	— 10 —	(Abel).
— — .	60°	— 15 —	(Abel).
— de l'influenza.........	100°	— 1 minute.	(Pfeiffer).
— —	60°	— 10 minutes.	(Pfeiffer).
— ictéroïde............	60°	quelques instants.	(Sanarelli).
— —	65°	instantanément.	
— pyocyanique..........	60°	après 10 minutes.	
— du chancre mou......	50°	quelques minutes.	
— du rouget du porc....	55°	quelques minutes.	(Lœffler).
— du choléra des poules.	58°	vite.	
— de la pneumo-entérite du porc..................	60°	quelques minutes.	
Bacillus botulinus (avec spores)......................	80°	après 1 heure.	(Van Ermenghem).
Bacillus botulinus (avec spores)......................	85°	— 15 minutes.	(Van Ermenghem).
Bacille du tétanos (avec spores)......................	100°	— 10 —	(Vaillard et Vincent).
Bacille du tétanos (avec spores)......................	115°	— 5 —	(Vaillard et Vincent).
Virus du charbon symptomatique (air sec)..............	80°	— 2 heures.	(Arloing, Cornevin et Thomas).
Virus du charbon symptomatique (air sec)..............	100°	— 20 minutes.	(Arloing, Cornevin et Thomas).
Virus du charbon symptomatique (eau bouillante)......	100°	— 2 —	(Arloing, Cornevin et Thomas).
Vibrion septique (virus frais).	100°	— 10 —	(Roux).
— — (virus sec)..	120°	— 10 —	(Roux).
Péripneumonie bovine.......	60°	— 1/2 heure.	
Fièvre aphteuse (virus)......	60°-70°	— 1/2 heure.	(Nocard).
Peste bovine................	52°-55°	quelques minutes.	(Nencki).
Clavelée (virus).............	56°-58°	après 3 minutes.	(Chauveau).
Vaccin......................	54°	— 10 —	(Chauveau).
Virus rabique...............	60°	— 10 —	(Sternberg).
— —	50°	— 1 heure.	(Celli).
Cladothrix Maduræ (culture sans spores)...............	60°	quelques minutes.	(Vincent).
Cladothrix Maduræ (culture avec spores)...............	75°	après 5 —	(Vincent).

(1) De Man, Ueber die Einwirkung von hohen Temperaturen auf Tuberkelbacillen. Thèse d'Iéna, 1893.

Cladothrix Maduræ (culture avec spores)	85°	après 3 minutes.	(Vincent).
Bacille du lait bleu	60°	quelques minutes.	(Nuelsen).
Bacillus prodigiosus	56°	après 5 minutes.	(Wasserzug).
Proteus vulgaris	60°	quelques minutes.	
Bacillus subtilis (avec spores).	100°	après 175 à 180′	(A. Meyer).
— — —	80°	après 75 heures.	(A. Meyer) (1).
Bacillus mesentericus ruber (spores)	130°	après 2 heures 1/2.	(Gruber).
Bacillus mesentericus ruber (spores)	127°	instantanément.	(Globig).
Bacillus mesentericus ruber (spores)	126°,3	après 2 minutes.	(Globig).
Bacillus mesentericus ruber (spores)	123°	— 10 —	(Globig).
Bacillus mesentericus ruber (spores)	113°-116°	— 25 —	(Globig).
Bacillus mycoides	100°	après 9 à 10 minutes.	(A. Meyer).
— —	80°	après 8 heures.	(A. Meyer).

Voici, d'après Duclaux (2), les limites de résistance des *Tyrothrix* d'un côté à l'état de Bacilles sans spores, développés dans le lait, de l'autre à l'état d'éléments sporulés dans un milieu de culture alcalin. La durée de chauffage prise comme base était d'une minute :

	Sans spores.	Avec spores.
Tyrothrix tenuis	90°-95°	120°
— *tenuior*	105°	120°
— *tenuissimus*	95°	110°-115°
— *filiformis*	105°	120°
— *distortus*	95°	105°
— *geniculatus*	80°	105°
— *turgidus*	80°	115°
— *scaber*	95°	110°
— *urocephalum*	95°	105°
— *catenula*	90°	105°

La différence de résistance des espèces a souvent été mise à profit pour isoler certaines d'entre elles d'autres avec lesquelles elles sont mélangées. Le moyen classique d'obtenir le *Bacillus subtilis* est de faire bouillir pendant trois quarts d'heure une infusion de foin. Parmi les germes qui se trouvent dans le liquide, ceux de ce Bacille survivent d'habitude seuls; c'est pour ce motif qu'on le nomme souvent *Bacille du foin* (*Heubacillus*). Miquel (3) a obtenu le *Bacillus ureæ*, exempt de *Micrococcus ureæ* et d'autres Bactéries de l'eau d'égout, en ensemençant une goutte de cette eau, portée pendant deux heures entre 80° et 90°, dans l'urine stérilisée. La méthode est de Pasteur (4), qui l'a établie pour isoler le *Vibrion septique* d'autres espèces l'accompagnant dans la terre végétale. Il lévige la terre avec de l'eau distillée et laisse au repos le liquide qui tient en suspension les éléments très ténus. Le dépôt, recueilli et très légèrement acidulé, est chauffé pendant quelques minutes à 90°, puis injecté sous la peau d'un animal. S'il existe du

(1) A. Meyer, Ein die supramaximalen Tötungszeiten betreffende Gesätzmässigkeit (*Ber. der deutschen bot. Gesell.*, 1906, XXIV, p. 340).
(2) Duclaux, Traité de microbiologie, vol. I, p. 280.
(3) Miquel, Nouvelles recherches sur le Bacillus ferment de l'urée (*Bull. de la Soc. chim.*, XXXII, 1879, p. 126).
(4) Pasteur, Sur le vibrion septique (*Bull. de l'Acad. de méd.*, 1877).

Vibrion septique dans la terre employée, l'animal meurt en présentant les symptômes tout spéciaux de la *septicémie de Pasteur*, *œdème malin* des Allemands.

Les actes physiologiques accomplis par les espèces se ressentent, d'une manière très nette, des variations de la température. Il en est des fermentations comme de la vitalité des individus qui les produisent ; il y a entre ces deux termes une corrélation intime et un rapport direct. L'un diminuant, l'autre doit infailliblement baisser à son tour, et inversement.

L'activité de la fermentation lactique, produite par le *Bacillus lacticus*, croît depuis une température assez basse jusqu'à 44°. De 44° à 53°, elle reste presque constante, puis décroît (1).

D'après Fitz (2), la température la plus favorable à la fermentation butylique du *Bacillus butylicus* est de 40°. La fermentation cesse à 45° ; la Bactérie n'est cependant pas tuée : elle ne meurt que vers 50°. Les spores meurent à 90°, en peu de temps.

Schlœsing et Müntz (3) ont constaté que la nitrification est nulle ou très faible à 5° ; elle s'établit bien nettement à 12° et croît jusqu'à 37° où elle présente son maximum. A partir de cette température, elle diminue. A 50°, on n'obtient plus que de très faibles quantités de nitrates et plus du tout à 55°. Une température de 100° tue le ferment en dix minutes.

Entre le degré de chaleur le plus favorable à la vie d'une espèce et celui qui l'abolit complètement, il existe un intervalle dans lequel les propriétés vitales de l'espèce, et en particulier la virulence des espèces pathogènes, diminuent de plus en plus, au fur et à mesure que la température se rapproche du degré mortel. La virulence, qui est à son maximum dans une culture, *s'atténue* graduellement lorsque la température s'élève, et peut finir par disparaître complètement, si l'on atteint un degré trop élevé. Les accidents déterminés par inoculation varient dans la même proportion ; violents au début, ils deviendront de plus en plus faibles et, à un moment donné, feront tout à fait défaut. A cet instant, cependant, la Bactérie n'est pas encore tuée ; semée dans un milieu nutritif, elle s'y reproduit.

Toussaint (4) a le premier attiré l'attention sur cette action atténuatrice de la chaleur, en montrant que du sang charbonneux, chauffé pendant cinq minutes vers 55°, ne donnait plus qu'une très faible atteinte de *sang de rate* aux moutons auxquels on l'inoculait. Chauveau (5) a repris la question et l'a soumise à des recherches méthodiques. D'après ce dernier expérimentateur, le *Bacillus anthracis*, chauffé très peu de temps à 55°, perd toute virulence ; seize minutes de chauffage à 52° donnent le même résultat. Quatorze minutes ne suffisent pas pour enlever toute action, mais la virulence est très amoindrie. Elle l'est de

(1) Richet, De quelques conditions de la fermentation lactique (*C. R. de l'Acad. des sc.*, LXXXVIII, 1879, p. 750).

(2) Fitz, Ueber Spaltpilzgährungen (*Ber. der deut. chem. Ges.*, IX, X, XI, XII et XV).

(3) Schloesing et Muntz, *C. R. de l'Acad. des sc.*, 1870, LXXXIX, p. 91 et 174).

(4) Toussaint, De l'immunité pour le charbon (*C. R. de l'Acad. des sc.*, XCI, 1880, p. 185 et 303).

(5) Chauveau, De l'atténuation des cultures virulentes par la chaleur (*C. R. de l'Acad. des sc.*, XCVI, 1883, p. 553, et XCIV, 1882, p. 1694).

moins en moins, si l'on réduit le temps de chauffage à douze, dix, huit, six minutes. Cette diminution ne s'aperçoit pas seulement dans les inoculations aux animaux, mais aussi dans les cultures. Sur un même milieu nutritif, le développement se fait en raison inverse du temps de chauffage. Ce qui prouve bien que la virulence est en rapport tout à fait intime avec la vitalité.

On verra plus loin quel grand parti on peut tirer de ces expériences et l'application que l'on fait des cultures atténuées pour les vaccinations.

Dessiccation. — L'eau est indispensable à la vie des Bactéries comme à celle de tous les êtres. Une dessiccation absolue les tue infailliblement dans un temps qui varie sans doute suivant la difficulté qu'éprouve le protoplasma à perdre toute son eau. La plupart des espèces supportent parfaitement une dessiccation relative, surtout à l'état de spores. On ne peut encore rien formuler de général. D'après Heim (1), beaucoup d'espèces, entre autres le *Bacille du tétanos*, le *Bacille de la diphtérie*, le *Bacille du charbon*, le *Bacille typhique*, le *Colibacille*, le *Staphylocoque doré*, le *Streptocoque*, le *Pneumocoque*, le *Tétragène*, pourraient résister à une dessiccation complète pendant des mois, même des années, tandis que d'autres, le *Vibrion cholérique*, le *Bacille du choléra des poules*, le *Micrococcus prodigiosus*, périraient assez rapidement.

Une dessiccation lente à température assez basse, 33°, semble, en privant la cellule d'un excès d'eau, la faire résister à un chauffage qui la tuerait très vite, si on l'y soumettait d'emblée. Le fait est peut-être dû à la formation abondante de spores pendant la première phase de l'expérience. C'est probablement la présence ou l'absence de spores chez les différentes espèces que l'on a observées à ce point de vue qui explique les différences remarquées.

Lumière. — D'une façon générale, la lumière semble n'exercer que peu d'influence sur le développement des Bactéries. En fait, beaucoup d'entre elles, celles qui se trouvent dans les couches profondes du sol, par exemple, doivent pouvoir s'en passer complètement, sans que pour cela leur vitalité en souffre. Beaucoup de décompositions qu'elles provoquent se passent en pleine obscurité.

Il est prouvé que certaines espèces sont attirées par les rayons lumineux. Dans un vase contenant de l'eau de macération de plantes qui fourmille de Bactéries, et que l'on éclaire d'un côté seulement, on reconnaît, par le trouble plus intense, que ces êtres se massent du côté éclairé. En opérant de cette façon, Zopf (2) a vu que le développement du *Beggiatoa roseo-persicina* se faisait bien mieux dans la partie éclairée du liquide nutritif que dans celle qui restait obscure. Les divers rayons du spectre n'ont pas une égale attraction. Si l'on fait tomber, à l'aide de l'objectif microspectral d'Engelmann, un spectre sur une préparation contenant des Bactéries mobiles, on les voit affecter, au bout de quelque temps, une disposition particulière et constante. Elles s'accumulent surtout dans l'ultra-rouge ; on en trouve déjà bien moins dans le jaune ; l'amas est faible dans le vert et diminue de plus en plus dans le bleu et le violet. Il semblerait, d'après cela, que les rayons calorifiques sont bien plus favorables que les rayons chimiques à la vie de ces êtres ; de nou-

(1) Heim, Die Widerstandfähigkeit verschiedener Bakterienartengegen Trocknung (*Zeitschr. fur Hygiene*, L, 1905, p. 123).

(2) Zopf, Die Spaltpilze, 1885.

velles expériences sont nécessaires cependant pour confirmer cette opinion. Des espèces, paraissant complètement immobiles, peuvent se mouvoir sous l'action de la lumière ; c'est ainsi que, d'après Engelmann (1), une Bactérie, qu'il dénomme *Bacterium photometricum*, ne devient mobile que sous l'influence des rayons lumineux d'une certaine intensité.

La lumière ne paraît avoir aucune action sur la production du pigment, chez beaucoup d'espèces chromogènes. La coloration apparaît tout aussi bien à l'obscurité.

Certaines sembleraient au contraire fuir les rayons solaires. Pour Warrington (2), la nitrification ne s'opère qu'à l'obscurité. Downes et Blunt (3) ont montré qu'une forte lumière pouvait être nuisible aux cultures de Bactéries, même mortelle pour beaucoup d'entre elles. Les expériences de Duclaux (4), faites sur des espèces définies, sont bien plus concluantes. Il en résulte que la lumière peut être une cause réelle de mort au bout d'un temps plus ou moins long, beaucoup plus court pour les espèces qui n'ont pas de spores, les *Micrococcus* par exemple, que pour celles qui en produisent. Dans ce dernier cas, la spore résiste plus longtemps que la cellule végétative. La mort est d'autant plus rapide que l'insolation est plus forte. Arloing (5) et Roux (6) ont vu diminuer très vite la vitalité de la *Bactérie du charbon*, sous l'action des rayons lumineux. D'après Roux, les spores de cette espèce sont presque toujours tuées après trente heures d'insolation ; la résistance la plus grande a été de cinquante-quatre heures. D'après Arloing, elles seraient moins résistantes que les Bacilles à cette action. Les spores insolées à l'abri de l'air restent vivantes un temps beaucoup plus long.

Des recherches de Pansini (7) n'ont fait que confirmer ces résultats. Il a opéré sur des espèces assez variées, *Micrococcus prodigiosus*, *Bacillus violaceus*, *Bacillus pyocyaneus*, les *Bacilles du charbon*, *du choléra*, *de la septicémie de la souris*, le *Micrococcus pyogenes albus*. Il exposait aux rayons du soleil des cultures sur gélose ou sur pommes de terre fraîchement inoculées ou des cultures en plein développement dont il se servait ensuite pour inoculer des milieux nouveaux, et comparait les résultats avec ceux donnés par des cultures également exposées au soleil, mais protégées par une cloche de verre noirci. Voici les conclusions de son mémoire :

1° Même la lumière diffuse a une action retardante sur le développement des microorganismes ;

2° La lumière directe du soleil a réellement une action stérilisante sur les microorganismes, en outre d'une action retardante sur leur développement ;

(1) Engelmann, Bacterium photometricum (*Unters. aus der phys. Labor.*, Utrecht, 1881).

(2) Warrington, *Journ. chem. Soc.*, London, XXXIII, p. 44.

(3) Downes et Blunt, *Proc. of Roy. Soc.*, 1886, p. 14.

(4) Duclaux, Action de la lumière sur les microbes (*C. R. de l'Acad. des sc.*, C et CI, 1885, et *Ann. de l'Inst. Pasteur*, 1887, p. 88).

(5) Arloing, Influence de la lumière blanche et de ses rayons constituants sur les propriétés du *Bacillus anthracis* (*Arch. de physiol.*, 1886, p. 920).

(6) Roux, De l'action de la lumière et de l'air sur les spores de la Bactéridie du charbon (*Ann. de l'Inst. Pasteur*, I, 1887, p. 445).

(7) Pansini, De l'action de la lumière solaire sur les microorganismes (*Rivista d'Igiene*, 1889). Analyse in : *Ann. de micr.*, 1890, p. 516.

3° L'action stérilisante proprement dite se produit quand les rayons du soleil tombent perpendiculairement ou à peu près sur la surface des cultures;

4° L'action stérilisante et retardante de la lumière exige, pour produire son effet, un temps variable selon les différents microorganismes;

5° Le degré de l'action de la lumière varie suivant le terrain de culture;

6° Les milieux nutritifs qui ont été exposés à la lumière restent propres à la vie des microorganismes;

7° Dans le bouillon, les spores du charbon ne résistent à la lumière qu'à peu près autant et peut-être même un peu moins que les Bacilles;

8° Desséchées, les spores résistent plus longtemps que dans le bouillon;

9° Les spores sont tuées par la lumière en tant que spores et non pas à l'état de Bacilles naissants;

10° La lumière retarde, mais n'empêche pas la sporulation;

11° Chez les espèces chromogènes, la lumière modifie la production du pigment, ordinairement en en diminuant l'intensité, quelquefois en en altérant la nature;

12° Avant de tuer les Bacilles du charbon, la lumière en atténue la virulence; ce charbon atténué n'a pas de qualités vaccinales, les cultures suivantes lui font récupérer sa virulence.

Ces résultats ont été confirmés depuis par d'autres expérimentateurs, Dieudonné (1), Marshall Ward (2), Orsi (3) surtout. Il a été nettement démontré que l'action nocive était bien due à l'intensité lumineuse, aux rayons lumineux; les radiations calorifiques n'ont pas ou presque pas à intervenir; il faut cependant reconnaître que Duclaux, Saverio (4) et Kruse (5) ont reconnu qu'une température élevée rendait plus rapides les effets de la lumière solaire; d'après Thiele et Wolf (6), alors que l'action est peu sensible vers 14°, elle est très nette de 30° à 40°.

Les recherches de Kotliar (7), de Dieudonné, de Beck et Schultz (8) prouvent que les divers rayons du spectre ont, à ce point de vue, une action bien différente. Les rayons qui présentent l'action bactéricide sont les rayons bleus, violets et ultra-violets, surtout les deux derniers, c'est-à-dire les rayons chimiques. Les rayons rouges et jaunes seraient

(1) Dieudonné, Beitrage zur Beurtheilung der Einwirkung des Lichtes auf Bakterien (*Arb. aus dem Kaiserl. Gesundheitsamte*, IX, 1894).

(2) Marshall Ward, Influence de la lumière sur les microbes (*Revue scient.*, 1894).

(3) Orsi, Einfluss des Sonnenlichtes auf die Virulenz des Typhusbacillus und des Choleravibrio (*Centralbl. für Bakt.*, Orig., XLIII, 1907, p. 846).

(4) Saverio, L'influenza della temperatura sull'azione microbicida della luce (*Ann. dell'Inst. d'Ig. di Roma*, II, 1890).

(5) Kruse, Ueber die hygienische Bedeutung des Lichtes (*Zeitschr. für Hygiene*, XIX, 1895).

(6) Thiele et Wolf, Ueber die Abtötung von Bakterien durch Licht (*Arch. für Hygiene*, LVII, 1906, p. 29, et LX, 1907, p. 29).

(7) Kotliar, L'influence de la lumière sur les Bactéries (Anal. in *Ann. de l'Inst. Pasteur*, VII, 1893, p. 430).

(8) Beck et Schultz, Ueber die Einwirkung sogenannten monochromatischen Lichtes auf die Bakterienentwicklung (*Zeitschr. für Hygiene*, XXIII, 1896, p. 490).

à peu près inactifs ; pour Wiesner (1), cependant, toutes les parties du spectre, rayons rouges compris, concourent à la destruction, les rayons infra-rouges étant même très actifs.

Le pouvoir bactéricide très net des rayons ultra-violets a été démontré par Nogier et Thévenot (2) à l'aide de la lampe de Kromayer. Courmont et Nogier (3) en ont fait une très intéressante application à la stérilisation de l'eau potable. Dans les liquides, l'action bactéricide est empêchée ou retardée par les substances qui peuvent arrêter les rayons ultra-violets, en particulier par les colloïdes; l'effet ne peut alors se produire que sous une très faible épaisseur. L'action paraît tout à fait indépendante de la formation d'ozone ou d'eau oxygénée.

La nature de la source de lumière n'influe en rien sur les résultats.

Le temps nécessaire à la lumière pour arrêter la pullulation et pour causer la mort des différents germes est loin d'être actuellement fixé. La durée voulue pour que cette action se produise paraît, du reste, varier dans de larges limites pour les différentes espèces et même pour une espèce suivant les conditions biologiques où elle se trouve, son âge en particulier. Aussi, les différents chiffres publiés ne doivent-ils avoir qu'une valeur relative. D'après Büchner (4) et Mink, il faudrait une heure d'insolation pour stériliser une eau tenant en suspension du *Bacillus coli communis*. Pansini a vu le soleil tuer le *Bacillus anthracis* en culture dans le bouillon en une heure à deux heures et demie ; les spores humides meurent en une demi-heure à deux heures ; desséchées, en six ou huit heures seulement. Janowski (5) dit que le *Bacille typhique* résiste environ six heures ; d'après Ledoux-Lebard (6), le *Bacille de la diphtérie* exposé sec et en couche mince à la lumière diffuse est tué après vingt-quatre heures. D'après Koch et Migneco (7), le *Bacille tuberculeux* commence à perdre de sa virulence en trois heures d'insolation et est souvent tué en cinq ou sept heures ; les expériences de Jousset (8) montrent toutefois qu'il faudrait quarante-huit heures d'exposition aux rayons solaires ou à la lumière diffuse pour obtenir la mort du *Bacille tuberculeux* des crachats. D'Arsonval et Charrin (9), expérimentant sur le *Bacille pyocyanique*, ont observé que l'action atténuatrice de la lumière solaire commençait à se manifester après deux heures d'exposition par un retard plus ou moins prononcé dans l'apparition du pigment qui aboutit à une suppression complète de la fonction chromogène si les effets persistent ; ce n'est qu'au bout d'un temps beaucoup plus

(1) Wiesner, Die Wirkung des Sonnenlichtes auf pathogenen Bakterien (*Arch. für Hygiene*, LXI, 1907, p. 1).

(2) Nogier et Thévenot, Pouvoir bactéricide de la lampe à vapeur de mercure et en quartz (*Congrès pour l'avancement des sciences*. Clermont-Ferrand, 1908).

(3) Courmont et Nogier, La stérilisation de l'eau potable par les rayons ultra-violets (*Acad. des sciences*, 22 février 1909). — Hygiène générale, V, 1910, p. 5.

(4) Büchner, Ueber den Einfluss des Lichtes auf Bakterien (*Centralbl. für Bakt.*, XII, 1893).

(5) Janowski, Zur Biologie der Typhusbacillen (*Centralbl. für Bakt.*, VIII, 1890).

(6) Ledoux-Lebard, Action de la lumière sur le Bacille diphtérique (*Arch. de méd. expér.*, 1893).

(7) Migneco, Azione della luce solare sulla virulenza dello Bacillo tuberculare (*Annali d'Igiene sperimentale*, V, 1895).

(8) Jousset, Action de la lumière solaire et de la lumière diffuse sur les crachats tuberculeux (*Soc. de Biol.*, 15 mars 1902).

(9) D'Arsonval et Charrin, Influence des agents cosmiques sur l'évolution de la cellule bactérienne (*Arch. de physiol.*, 1894, p. 335).

long que la végétation est atteinte. Vincent (1), expérimentant sur le *Bacille typhique*, a vu que les rayons solaires le tuaient en quatre à dix heures dans l'eau ou sur de la terre humide, suivant les conditions d'action, agissant plus rapidement lorsque le milieu est tout à fait transparent, et plus lentement lorsque le milieu est trouble. Après une insolation de huit à dix heures, Orsi trouve encore vivants quelques *Bacilles typhiques* et un assez grand nombre de *Vibrions cholériques*.

Les produits sécrétés par les Bactéries paraissent aussi sensibles à l'action de la lumière. Les toxines s'atténuent assez vite sous l'influence de fortes radiations, mais surtout en présence d'oxygène (2) ; Green (3) l'a aussi remarqué pour les diastases. Cernovodeanu et Henri (4) ont observé la destruction de la toxine tétanique par les rayons ultra-violets, après dilution dans de l'eau, pour écarter l'action empêchante des colloïdes du bouillon; cette altération est tout à fait indépendante de l'oxygène.

Ces diverses expériences démontrent que l'action de la lumière sur la vitalité des Bactéries est réelle, et qu'elle est intimement liée à l'action de l'oxygène. Il se produirait souvent une très forte oxydation, nuisible à la vie. Duclaux (5) a montré, en effet, que l'oxydation des matières organiques se faisait très activement à la lumière. Conclusion importante à tirer pour l'hygiéniste : l'air et le soleil sont des barrières excellentes à opposer au développement de ces êtres.

Les *rayons Röntgen* ne paraissent pas avoir d'influence sensible sur le développement et la vitalité des Bactéries (6), d'après la plupart des expérimentateurs. Cependant, d'après les recherches de Rieder (7), on observerait, déjà après vingt à trente minutes d'action, un arrêt dans la croissance et la mort. Par contre, les recherches de Russ (8) concluent à une action nulle ; les expériences de Calcaterra (9) montrent que ces rayons n'ont aucun effet sur la toxine diphtérique.

D'après Gerharz (10), les rayons Röntgen auraient, sur la toxine diphté-

(1) Vincent, Influence de la lumière solaire sur le Bacille de la fièvre typhoïde (*Revue d'hygiène*, XX, 1898, p. 230).

(2) Piazza, Influenza della luce solare sulla tossina difterica (*Annali d'Igiene sperimentale*, 1895, p. 521).

(3) Green, The influence of light on diastase (*Ann. of Bot.*, VIII, 1894, p. 370).

(4) Cernovodeanu et Henri, Action de la lumière ultra-violette sur la toxine tétanique (*Acad. des sc.*, XCXLIX, 2 août 1909, p. 365).

(5) Duclaux, *Ann. de l'Inst. agr.*, 1886.

(6) Mink, Zur Frage über die Einwirkung der Röntgen'schen Strahlen auf Bakterien (*Münch. med. Wochenschr.*, 1896, nos 5 et 9). — Wittlin, Les rayons Röntgen exercent-ils une action quelconque sur les Bactéries? (*Ann. de micr.*, VIII, 1896, p. 514). — Pott, Concerning the action of X rays on cultivation of tubercle Bacillus (*The Lancet*, 1897, II, no 21). — Blaise et Sambuc, De l'action des rayons X sur le *Pyocyaneus* et la Bactéridie charbonneuse (*Soc. de Biol.*, 10 juillet 1897). — Beauregard et Guichard, Action des rayons X sur certains caractères des microbes (*Soc. de Biol.*, 24 juillet 1897). — Rieder, Wirkung der Röntgenstrahlen auf Bakterien (*Münch. med. Wochenschr.*, 25 janvier 1898). — Wolfenden et Forbes-Roos, A preliminary note on the action of Roentgen rays upon the growth and activity of Bacteria and micro-organisme (*The Lancet*, 25 juin 1898). — Zeit, *The Journal of the American med. Association*, nov. 1901.

(7) Rieder, Troehmals die bakterientötende Wirkung der Roentgenstrahlen *Münch. med. Wochenschr.*, no 10, 11 mars 1902).

(8) Russ, Einiger über den Einfluss der Röntgenstrahlen auf Mikroorganismen *Arch. für Hygiene*, LVI, 1906, p. 341).

(9) Calcaterra, Intorno all'azione dei raggi di Roentgen sulla tossina difterica (*Ann. de l'Inst. Maragliano*, III, 1909, p. 304).

(10) Gerharz, Diphteriegift und Roentgenstrahlen (*Berlin. klin. Wochenschr.*, 4 oct. 1909, p. 1800).

rique, une action atténuante réelle, qui s'exercerait non seulement *in vitro*, mais encore chez l'animal inoculé.

Les expériences de Pfeiffer et Friedberger (1) montrent que les rayons du *radium* possèdent une action bactéricide réelle, quoique assez faible, puisqu'il faut une exposition de quarante-huit heures à une distance de 1 centimètre pour tuer des cultures de *Bacille typhique*, et de trois jours pour tuer les spores charbonneuses. Dorn, Baumann et Valentiner (2) disent en outre que l'action est toute superficielle et ne s'opère que médiocrement ou pas du tout dans l'intérieur de liquides. D'après Bouchard et Balthazard (3), ces rayons n'agiraient guère sur le pouvoir chromogène des microbes produisant un pigment qui reste adhérent à leur substance, comme le *Micrococcus prodigiosus*, mais feraient rapidement baisser la production des pigments qui diffusent dans le milieu, comme ceux des *Bacilles fluorescents* et du *Bacille pyocyanique*.

Pression. — P. Bert (4) a montré que l'oxygène comprimé tuait les Bactéries en un temps assez court. Les fermentations et les putréfactions s'arrêtent vite en présence de ce gaz comprimé à 8 ou 10 atmosphères. L'air comprimé est bien moins actif. Certes (5) a pu faire subir à des liquides putréfiés une pression de 450 à 500 atmosphères sans arrêter la putréfaction, et, d'après lui, les cultures de *Bacillus anthracis* gardent leur virulence après avoir été exposées pendant vingt-quatre heures à 600 atmosphères. Le principal facteur, dans les expériences de P. Bert, paraît donc être l'oxygène, dont l'action comburante serait exaltée par la pression.

Les expériences de Chauveau (6), sur l'action de l'oxygène comprimé sur le *Bacillus anthracis*, ont donné des résultats différents de celles faites par Certes sur la même espèce avec l'air. La mort arrive au bout d'un temps variable, suivant la force de la pression, mais elle ne survient que graduellement ; la vitalité diminue peu à peu, et, parallèlement avec elle, la virulence. D'où formation, sous cette influence, de virus atténués dont l'expérimentateur peut graduer la force, en variant la pression à laquelle il les soumet.

Les choses se passent-elles en l'absence d'air ou en la présence de très faibles quantités d'oxygène, juste nécessaires au maintien de la vie, comme dans l'air ou l'oxygène pur ? Des expériences manquent complètement sur ce point.

D'Arsonval et Charrin (7), en soumettant le *Bacille pyocyanique* à une pression de 50 atmosphères sous l'acide carbonique, ont observé une

(1) Pfeiffer et Friedberger, Ueber die bakterientötende Wirkung der Radiumstrahle (*Berlin. klin. Wochenschr.*, 1903, p. 640).

(2) Dorn, Baumann et Valentiner, Ueber die Einwirkung der Radiumemanation auf pathogene Bakterien (*Zeitschr. für Hygiene*, LI, 1905, p. 328).

(3) Bouchard et Balthazard, Action de l'émanation du radium sur les Bactéries chromogènes (*Acad. des sc.*, 2 avril 1906).

(4) P. Bert, Oxygène comprimé (*C. R. de l'Acad. des sc.*, LXXX, p. 1579, et LXXXIV, p. 1130).

(5) Certes, De l'action des hautes pressions sur les phénomènes de putréfaction (*C. R. de l'Acad. des sc.*, XCIX, p. 385).

(6) Chauveau, De l'atténuation des cultures virulentes par l'oxygène comprimé (*C. R. de l'Acad. des sc.*, XCVIII, 1884, p. 1332, et *Ibid.*, C, 1885, p. 420).

(7) D'Arsonval et Charrin, Pression et microbes (*Soc. de Biol.*, 20 mai 1893).

diminution graduelle de la vitalité et du pouvoir chromogène, de telle sorte qu'après six heures d'exposition à un tel traitement le microbe avait perdu tout pouvoir de produire de la matière colorante et presque toute puissance de pullulation. Ici, cependant, il y a peut-être lieu de faire intervenir l'action de l'acide carbonique avec celle propre à la pression. C'est probablement aussi la raison des résultats positifs obtenus par Malfitano (1), faisant agir l'acide carbonique et l'oxyde de carbone à des pressions de 55 à 60 atmosphères.

Roger (2), de son côté, a pu faire agir, sans grand résultat, des pressions énormes, de 967 à 2 909 atmosphères, sur divers microbes, le *Staphylocoque doré*, le *Streptocoque de l'érysipèle*, le *Colibacille*, le *Bacille du charbon*. Le *Staphylocoque doré* et le *Colibacille* ne lui ont montré aucune modification ; le *Bacille du charbon* avec spores n'a été que très légèrement atténué à 3 000 atmosphères ; sans spores, il supporte encore facilement 1 000 atmosphères, mais s'atténue vite au-dessus ; le *Streptocoque* se conduit de même.

Tout ceci tend à démontrer que, dans les conditions ordinaires, l'action de la pression peut être considérée comme négligeable et qu'en outre les espèces se comportent envers ce facteur d'une façon très différente.

Électricité. — L'action de l'électricité a été très discutée. Cohn et Mendelsohn (3) n'ont obtenu que peu de résultats dans leurs expériences instituées pour l'étudier. Des décharges électriques faibles et des courants continus de peu d'intensité n'ont pas d'action appréciable sur le développement des Bactéries dans le *liquide minéral de Cohn*, qui a servi comme milieu. Un seul élément n'a, suivant sa force, aucune action ou une simple action retardatrice. Les fortes décharges ou des courants puissants tuent en peu de temps les Bactéries en suspension dans le liquide. Ces derniers effets semblent dus exclusivement aux changements produits dans le liquide par l'électrolyse. Avec deux forts éléments, la stérilisation est complète au pôle positif, où se portent les acides, en douze à vingt-quatre heures; elle est loin d'être complète au pôle négatif, où sont les alcalis. C'est la réaction du liquide qui est le principal facteur du phénomène. Ce qui corrobore encore cette opinion, c'est que le liquide du pôle positif fournit une abondante végétation de Levures et de Moisissures, qui aiment les milieux acides, alors qu'il est impropre au développement des Bactéries, qui fourmillent, au contraire, au pôle négatif, où elles trouvent une réaction alcaline. Une forte batterie de trois éléments tue, en vingt-quatre heures, toutes les Bactéries en suspension dans la liqueur. Ici encore, la part du changement d'état du milieu n'a pas été faite.

C'est aussi à l'action chimique concomitante qu'il faut rapporter les résultats annoncés plus récemment par Apostoli et Delaquerrière (4) et Prochownick et Spaeth (5). Il en est de même de ceux que signalent

(1) Malfitano, Sul comportamento dei microorganismi all'azione dei gasi compressi (*Boll. della Soc. med.-chir. di Pavia*, 1897).

(2) Roger, Action des hautes pressions sur les microbes (*Soc. de Biol.*, 3 déc. 1894).

(3) Cohn et Mendelsohn, Ueber Einwirkung des electrischen Stromes auf die Vermehrung der Bacterien (*Beitr. zur Biol. der Pflanzen*, 1876, III, p. 141).

(4) Apostoli et Delaquerrière, *C. R. de l'Acad. des sc.*, 21 avril 1890.

(5) Prochownick et Spaeth, *Deutsche med. Wochenschr.*, 1890, p. 564.

Fermi (1), Kruger (2), Verhoogen (3), et probablement aussi Zeit (4).

D'Arsonval et Charrin (5) se sont mis à l'abri de cette cause d'erreur et ont étudié l'action de l'électricité sans faire intervenir de facteurs étrangers, production de chaleur ou modifications chimiques principalement; pour cela, ils ont eu recours aux courants sinusoïdaux à haute ou à basse fréquence. En expérimentant sur le *Bacille pyocyanique*, ils ont observé l'influence évidente de l'électricité se traduisant, dans ce cas particulier, par une diminution de la puissance chromogène d'abord, puis par une diminution de la vitalité du microbe. En employant les produits solubles seuls, la toxine diphtérique et la toxine pyocyanique, ces savants ont remarqué une atténuation manifeste de la virulence et même une disparition de toute nocivité après un temps d'exposition suffisant.

Bergonié et Tribondeau (6), en soumettant des cultures de *Colibacille* à l'action d'étincelles électriques, ont observé une stérilisation superficielle seulement. Il est difficile, dans une telle action, de faire la part de l'électricité, puis celle de la chaleur produite, des rayons émis, des substances chimiques formées.

Smirnow (7) dit pouvoir obtenir, par l'électrolyse de toxine diphtérique, une véritable antitoxine. Marmier (8), en répétant ses expériences dans les mêmes conditions, n'a obtenu qu'une destruction de la toxine, comme d'Arsonval et Charrin, et pas de formation d'antitoxine.

Magnétisme. — Rien de bien certain ici. Dubois (9) a signalé l'influence de forts aimants sur l'orientation des colonies du *Micrococcus prodigiosus*, sans chercher toutefois à éviter de nombreuses causes d'erreur. La fermentation alcoolique occasionnée par la Levure de bière est, d'après d'Arsonval (10), manifestement retardée par l'influence du champ magnétique. Il en est peut-être de même pour les fermentations bactériennes.

Agitation. — L'agitation des milieux liquides où vivent des Bactéries est une condition défavorable au développement de ces êtres. C'est surtout aux Bactéries aérobies qu'elle doit nuire. Elle brise le voile qu'elles forment à la surface, et les fait tomber dans des couches profondes, où elles ne trouvent plus assez d'oxygène pour vivre à leur aise. Les hygié-

(1) Fermi, Reinigung der Abwässer durch Elektricität (*Arch. für Hygiene*, XII, 1892).

(2) Kruger, Ueber Einfluss des Constanten electrichen Stromes auf Wachstum und Virulenz der Bakterien (*Zeitschr. für klin. Med.*, XXII, 1893).

(3) Verhoogen, Action du courant galvanique constant sur les organismes pathogènes (*Bull. de la Soc. belge de micr.*, XI, 1891).

(4) Zeit, Effect of direct, alternating Testa-currents and X rays on bacteria (*Journ. of the American med. Association*, nov. 1901).

(5) D'Arsonval et Charrin, Électricité et microbes (*Soc. de Biol.*, 15 juillet 1893). — Les toxines et l'électricité (*Soc. de Biol.*, 25 janvier 1896).

(6) Bergonié et Tribondeau, Fulguration des microbes (*Soc. de Biol.*, LXVI, 1909, p. 663).

(7) Smirnow, Ueber die Behandlung der Diphterie mit Antitoxinen, die ohne Vermittelung der thierischen Organismus darstelbar sind (*Berl. klin. Wochenschr.*, 1894, p. 683). — Ueber die Behandlung der Diphterie mit künstlich dargestelten Antitoxinen (*Berl. klin. Wochenschr.*, 1895, p. 645 et 675). — Note sur la détermination du pouvoir neutralisant du sérum antidiphtérique (*Arch. des sc. biol. de Saint-Pétersbourg*, IV, 1895, p. 328).

(8) Marmier, Les toxines et l'électricité (*Ann. de l'Inst. Pasteur*, X, 1896, p. 469).

(9) Dubois, Influence du magnétisme sur l'orientation des colonies microbiennes (*C. R. de la Soc. de Biol.*, 1886, p. 127).

(10) D'Arsonval, *loc. cit.*, 1886, p. 128.

nistes peuvent noter cette observation et se rappeler que les masses d'eau immobiles, les citernes et les puits, doivent offrir, à bien des espèces nuisibles, de meilleures conditions de prolifération que les eaux courantes de fontaine et de rivière. D'après Pohl (1), le mouvement tourbillonnant déterminé par une puissante turbine diminuerait dans des proportions considérables (90 p. 100?) le nombre des Bactéries de l'eau soumise à son action ; il y a là, certainement, un phénomène complexe où la seule action mécanique n'est pas en jeu ; l'oxydation plus forte qui se produit doit jouer un rôle, la simple centrifugation aussi.

Pour Galli-Valerio (2), l'agitation, pour beaucoup d'espèces, favoriserait plutôt le développement, n'entravant en rien la formation de spores ni la production de pigment, ne modifiant pas les caractères morphologiques.

Une agitation modérée change facilement certains caractères de cultures et d'aspect; elle produit une dissociation des articles, dans le cas où ils ont une tendance à rester réunis en voile ou en amas filamenteux, comme c'est le cas pour le *Bacille de la tuberculose* et le *Bacille du charbon*, par exemple ; c'est la raison de l'obtention de ce que l'on a appelé les *cultures homogènes* de telles espèces.

MICROORGANISMES.

L'action que peuvent exercer, sur les Bactéries, d'autres organismes inférieurs, vivant côte à côte dans le même milieu, est des plus variable. Elle paraît dépendre surtout des besoins de ces autres êtres en aliments. Il se produit souvent une véritable *concurrence vitale*. Ceux qui se plient le mieux aux conditions du milieu, ceux qui s'assimilent le mieux ses éléments composants sont ceux qui ont le plus de chance de prendre le dessus ; les autres s'amoindrissent, puis disparaissent. En seconde ligne interviennent les modifications que ces êtres peuvent faire subir au milieu, qu'ils rendent souvent défavorable au développement d'autres espèces ou même tout à fait mortel pour elles.

Cette influence n'est pas toujours mauvaise, mais parfois favorable à la vie simultanée de plusieurs types. Il est des cas où cette association apparaît comme des plus utile et même comme nécessaire à la vie d'un type déterminé dans les conditions présentes du milieu. C'est ainsi que l'on a vu que la présence dans un milieu d'espèces aérobies pouvait y permettre le développement d'espèces anaérobies qui n'auraient pas pu végéter sans l'action absorbante à l'égard de l'oxygène exercée par les premières. Dans bien des cas, il se produit certainement une véritable *symbiose*.

D'une façon générale, cependant, il y a le plus souvent *antagonisme* entre ces espèces qui vivent aux dépens d'un même milieu, parce que leurs besoins sont similaires. Les espèces se nuisent réciproquement et les plus fortes étouffent les plus faibles, véritable lutte pour l'existence. C'est ce que l'on observe surtout dans le sol et dans les eaux, ces deux réceptacles d'organismes inférieurs ; on en verra plus loin des exemples frappants et instructifs.

(1) Pöhl, Sur la filtration de l'eau de la Néva (*Wratsch*, 1886, nos 34 et 35, en russe).
(2) Galli-Valerio, Influence de l'agitation sur le développement des cultures (*Centralbl. für Bakt.*, Originale, XXXVII, 1904, p. 151).

A ce point de vue, il est impossible de dire quelque chose de bien général ; l'expérience seule apprend comment telle ou telle espèce se comporte dans des conditions déterminées.

Les actions que les diverses espèces de Bactéries peuvent, en vivant ensemble, exercer les unes sur les autres, sont un point des plus intéressant. La concurrence vitale joue certainement un grand rôle dans la façon dont se comportent les organismes pathogènes dans le milieu extérieur ou même dans les organismes qu'ils attaquent. Les faits connus seront exposés lors de l'étude des espèces.

L'influence des Saccharomycètes, qui se trouvent assez fréquemment avec les Bactéries dans bien des milieux, est très peu connue. Dans la lutte, ce sont tantôt les unes, tantôt les autres, qui l'emportent, suivant les conditions du milieu et la nature des espèces qui s'y rencontrent. Il peut y avoir aussi une véritable symbiose, comme dans le képhir.

Les Moisissures paraissent plus nettement être de véritables antagonistes (1) des Bactéries.

Mais ici la seule réaction du milieu est peut-être la raison dominante ; les Moisissures préfèrent les milieux acides, les Bactéries ceux à réaction alcaline.

Les Amibes, les Infusoires, les Flagellés surtout, paraissent détruire de nombreuses Bactéries qui font vraisemblablement partie de la nourriture de ces organismes. Ce serait là une des grandes causes de l'épuration naturelle des eaux (2).

III. — ACTION DES BACTÉRIES SUR LES MILIEUX OÙ ELLES VIVENT.

Les Bactéries se comportent, vis-à-vis des milieux où elles vivent, comme tous les êtres vivants. Elles y puisent des aliments qu'elles peuvent utiliser pour leur nutrition, et y rejettent les résidus de leur activité vitale. Ces échanges, qui sont souvent très complexes parce qu'ils intéressent plusieurs points à la fois, donnent naissance à des phénomènes apparents, portant d'un côté sur les caractères des Bactéries et de l'autre sur ceux du milieu. Ces manifestations peuvent varier suivant l'espèce qui est en question, les conditions physiologiques où elle se trouve et la composition du milieu. Elles sont certainement en rapport très intime avec la nutrition, et pour beaucoup son résultat direct ; il n'est cependant pas possible, dans l'état actuel de la science, de les rattacher toutes et en toute assurance à cette fonction. Et même, bien que ces divers phénomènes aient entre eux des relations certaines, de véritables airs de famille, on est forcé de les séparer plus qu'ils ne le sont en réalité dans l'ordre naturel, si l'on ne veut pas s'aventurer par trop dans l'hypothèse. C'est, du reste, d'une commodité plus grande pour l'étude.

Il n'est pas encore possible d'arriver à une généralisation de ces processus. Ils peuvent donner lieu à un simple dédoublement de produits contenus dans le milieu et attaqués par les Bactéries ; dans la fermentation ammoniacale de l'urée, par exemple, la molécule d'urée se

(1) Duchesne, Antagonisme entre les Moisissures et les Microbes. Thèse de Lyon, 1897.

(2) Catterina, Sull'importanzia dei Protozoi nella purificazione delle acque Padova, 1896.

dédoublerait en deux molécules de carbonate d'ammoniaque. Ils aboutissent parfois à une oxydation extrême dont les produits ultimes sont de l'acide carbonique et de l'eau ; souvent il ne se fait qu'une oxydation partielle, comme on le voit dans la fermentation acétique ; nous avons vu que ces phénomènes pouvaient être sous la dépendance d'oxydases. Les phénomènes observés peuvent être des phénomènes de réduction, dus peut-être à l'action secondaire d'hydrogène naissant produit par la Bactérie ou à des diastases réductrices ; c'est ce qui s'observe, en particulier, pour de nombreux organismes des putréfactions, qui réduisent alors les sulfates de l'eau ou du sol en produisant un dégagement d'hydrogène sulfuré.

La destruction complète, la transformation ultime du milieu, n'est que bien rarement, on pourrait même dire jamais, dans la nature, comme dans les expériences, l'œuvre d'une seule espèce, mais plutôt d'une série d'espèces qui se succèdent, substituant et ajoutant leurs modifications, de telle sorte qu'une agit après l'autre, aux dépens de produits déjà modifiés par la première, qui, bien souvent, ne peut plus continuer à végéter dans le milieu qu'elle a modifié.

Il semble bien que ces processus de destruction de la matière organique soient la véritable fonction, ou tout au moins la fonction fondamentale, que les Bactéries aient à remplir dans le monde. Ce sont des agents de décomposition des milieux où elles vivent ; il est probable que les autres modifications observées ne sont pour elles que des fonctions secondaires, surajoutées ou acquises. En tout cas, on peut dire que la propriété de décomposer la matière organique est un fond commun à toutes les espèces ; ce n'est qu'accessoirement, accidentellement peut-être, que certaines produisent des manifestations pathogènes, chromogènes ou autres. Il suit de là que les phénomènes de la putréfaction peuvent être considérés comme le véritable type des actions provoquées par les Bactéries.

BACTÉRIES DE PUTRÉFACTION

C'est dans les décompositions de substances animales ou végétales qu'ont été découvertes les Bactéries. Aussi a-t-on pensé de suite qu'elles devaient jouer un rôle important dans la production de ces phénomènes. On réserve, en général, le nom de *putréfaction* à tous les dédoublements des substances organiques azotées et principalement des matières albuminoïdes, *occasionnés surtout par des Bactéries*, accompagnés de produits volatils d'odeur infecte. Le phénomène est d'habitude très complexe. La complexité résulte de la diversité des matériaux qui se putréfient et de la présence, dans presque tous les cas, d'un nombre plus ou moins grand d'espèces différentes, dont l'action peut considérablement varier (1). Des Moisissures, des Levures, des animaux inférieurs, contribuent aussi, peut-être, dans une mesure qui n'est pas connue, au phénomène de la putréfaction.

Les Bactéries de la putréfaction sont tantôt des espèces aérobies, tantôt des espèces anaérobies. Ces dernières ne se développent, toutefois,

(1) Consulter surtout : Duclaux, Chimie biologique (*Encycl. chim.* de Frémy, p. 726 et suiv.).

que lorsque l'oxygène est complètement ou relativement absent du milieu. Ainsi, dans la nature, si l'on observe un liquide qui se putréfie, on voit d'abord les aérobies envahir sa masse, et s'y développer luxurieusement, trouvant en abondance des aliments et de l'oxygène. Au fur et à mesure qu'ils consomment ce gaz, ils quittent les couches profondes et se rapprochent de la surface, où ils finissent par se localiser. A ce moment, les anaérobies peuvent prospérer, protégés de l'accès de l'air par le voile que forment à la surface les corps des premiers occupants. L'aspect du phénomène change alors. Tandis que, grâce à la présence d'oxygène en abondance, les aliments pouvaient être complètement brûlés par les premiers êtres et transformés en composés très simples, inodores, comme l'acide carbonique et l'eau, ils ne subissent plus maintenant que des modifications bien moins complètes. Les résidus sont d'une complexité plus grande ; c'est, suivant les cas, des ammoniaques composées, des mercaptans, des acides gras volatils, d'odeur repoussante, des produits d'odeur fécaloïde très pénétrante, comme l'indol, le scatol. De plus, beaucoup d'anaérobies peuvent produire de l'hydrogène gazeux qui, rencontrant, à l'état naissant, du soufre, du phosphore, dans les composés albuminoïdes, donne de l'hydrogène sulfuré et de l'hydrogène phosphoré, dont la mauvaise odeur vient s'ajouter à celle des substances précédentes et former le fumet repoussant de putréfaction, variant suivant la qualité et la quantité de ses divers composants. La présence d'hydrogène naissant n'est du reste pas nécessaire pour expliquer la production d'hydrogène sulfuré. Nous avons vu précédemment (p. 62) qu'ils pouvaient s'opérer sous l'influence de diastases réductrices, d'hydrogénases, sécrétées par certains microbes. A côté de ces produits volatils, on trouve des produits fixes, résidus, comme les premiers, de l'activité vitale des Bactéries. Au premier rang sont la leucine, la tyrosine, le glycocolle et enfin des ptomaïnes diverses, ces bases toxiques accompagnant si souvent les déchets de la vie des cellules. La putréfaction des solides est toujours précédée d'une dissolution préalable qu'opèrent les diastases sécrétées.

Les espèces causes de la putréfaction sont nombreuses et encore peu connues, pour la plupart, tant au point de vue morphologique qu'au point de vue physiologique. Ce sont le plus souvent des Bacilles longs ou courts, parfois des *Micrococcus* ou des formes spiralées très mobiles. La part à attribuer à chaque espèce n'est pas encore déterminée.

Malgré cette incertitude où l'on est encore sur la part qui revient aux différentes espèces qui se rencontrent dans les putréfactions, on peut déjà se faire une idée générale, schématique en quelque sorte, du phénomène, au moins dans ses grandes lignes. Il est du reste facile de suivre pour ainsi dire pas à pas les modifications qui se produisent, en observant la putréfaction des produits azotés, de la viande ou du poisson par exemple, qu'on laisse putréfier dans l'eau, putréfaction qu'on peut prendre comme type. Il faut un temps très long, plusieurs années parfois, pour que la destruction soit complète, par conséquent que le processus de putréfaction soit entièrement terminé. Il y a vraiment dans ce phénomène une succession non interrompue non seulement de véritables flores bactériennes, mais encore de flores d'organismes inférieurs autres, de telle sorte qu'à une de ces flores doit correspondre une phase déterminée du processus.

La part qui revient aux Bactéries aérobies dans une telle putréfaction peut se diviser en trois temps ou trois phases. Tout au début, dans une première phase, on rencontre en abondance les saprophytes ordinaires communs partout, les *Bacillus subtilis*, *Bacillus mesentericus vulgatus*, *Bacterium termo*, les Bacilles I, II et III décrits par Mouginet (1); on ne perçoit encore qu'une odeur faible, plutôt fade; ce n'est pas encore la vraie putréfaction. Un jour ou deux après, suivant la température, les phénomènes s'accentuent, l'odeur devient plus forte surtout; les espèces précédentes ont cédé le pas à d'autres, où dominent les *Bacillus fluorescens liquefaciens*, *Bacillus fluorescens putridus*, *Bacillus violaceus*; c'est une seconde phase du phénomène. Quelques jours après, l'odeur est nettement putride; à ce moment, troisième phase, apparaissent les *Proteus vulgaris* et *Proteus mirabilis* qui dominent bientôt et deviennent envahissants. C'est alors, et cela se conçoit très bien quand on connaît les particularités biologiques de ces espèces, qu'apparaissent dans les putréfactions les produits les plus toxiques et les plus dangereux, les produits obtenus dans le début de la putréfaction, dans les deux premières phases, étant inoffensifs ou peu actifs. Les aérobies agissent surtout dans la putréfaction des matières albuminoïdes déjà hydrolysées, peptonisées surtout. Leur action est incontestable; le *Colibacille*, par exemple, développe souvent, aux dépens des peptones, des odeurs souvent infectes, véritablement putrides, bien que n'exerçant aucune action sur les matières protéiques naturelles. Le *Proteus vulgaris* agit ainsi surtout sur les peptones, mais peut également attaquer la fibrine et la caséine.

L'envahissement du milieu par les microbes aérobies permet le développement des anaérobies, qui seuls, pour Bienstock (2) et Rettger (3), pourraient occasionner la putréfaction de certaines substances que les diastases sécrétées par les premières ne peuvent pas attaquer. C'est ainsi que la fibrine ne se putréfierait pas sous l'action des espèces aérobies qui viennent d'être citées, mais seulement sous l'attaque de différentes espèces anaérobies qui sont surtout le *Bacillus putrificus coli*, le *Clostridium fœtidum* et, après, eux au second rang, le *Vibrion septique* et le *Bacille du charbon symptomatique*.

Avec l'albumine, on peut faire la même remarque; ce sont surtout les anaérobies qui peuvent l'attaquer. D'après Kerry (4), l'attaque par le *Vibrion septique* donne des acides gras, de la leucine, de l'acide hydroparacoumarique, un corps huileux, puant, soluble dans l'éther, de l'hydrogène et du méthane. Nencki (5), expérimentant sur la sérine, a trouvé avec le *Bacille du charbon symptomatique*, le *Bacillus liquefaciens magnus* et le *Bacillus spinosus*, tous anaérobies, des

(1) Mouginet, Quelques Bactéries des putréfactions. Thèse de Nancy, 1890.

(2) Bienstock, Untersuchungen über die Aetiologie der Eiweissfaülnis (*Arch. für Hygiene*, XXXVI, 1899). — Recherches sur la putréfaction (*Ann. de l'Inst. Pasteur*, XIII, 1899, p. 854).

(3) Rettger, Studies on putrefaction (*Journ. of biol. Chemistry*, 1906, II, p. 71; 1908, IV, p. 45).

(4) Kerry, Ueber die Zersetzung des Eiweisses druch die Bacillen des malignen Œdems (*Wiener Monatshefte für Chemie*, X, 1889).

(5) Nencki, Untersuchung über die Zersetzung des Eiweisses durch anaerobe Spaltpilze (*Sitzungsb. der k. Akad. d. Wissenschaften*, Vienne, 1889). — Nencki et Sieber, Zur Kenntniss der bei der Eiweissgährung auftretenden Gase (*Ibid.*).

acides gras et aromatiques, de l'acide hydroparacoumarique, de l'acide phénylpropionique, de l'acide scatolcarbonique, du mercaptan de méthyle.

Pour Tissier et Martelly (1), dans la putréfaction de la viande, le rôle principal doit être dévolu aux anaérobies qui seuls pourraient achever la transformation de l'albumine et de ses dérivés. Ils résument de la façon suivante la marche d'une putréfaction.

Avec la viande fraîche, au contact de l'air, dès les premières heures la fermentation des matières sucrées s'opère activement et il se produit une attaque légère des albuminoïdes ; on trouve, après vingt-quatre heures, un peu de peptone, de la leucine, de la tyrosine, un peu d'ammoniaque. Les ensemencements ne montrent que des aérobies, ferments mixtes protéolytiques et peptolytiques, attaquant à la fois le sucre et l'albumine : ce sont les *Micrococcus flavus liquefaciens*, *Micrococcus pyogenes albus*, *Bacillus coli communis*, *Micrococcus pyogenes*, *Micrococcus griseus non liquefaciens*, *Bacillus filiformis*.

Après trois à quatre jours, l'attaque des albumines a augmenté, l'odeur est légèrement putride. Les anaérobies apparaissent ; ce ne sont encore que des ferments mixtes, *Bacillus perfringens* et *Bacillus fermentans sporogenes*.

Au bout de huit à dix jours, le sucre a disparu, les graisses saponifiées sont devenues des savons ammoniacaux, la glycérine est brûlée, l'odeur est très fétide. La matière protéique est énergiquement attaquée, avec production d'hydrogène sulfuré, d'indol, de phénols, d'ammoniaque. On trouve des ferments protéolytiques, *Bacillus putridus gracilis*, *Bacillus putrificus coli*, et des peptolytiques purs, *Micrococcus magnus anaerobius*, *Proteus Zenkeri*, en plus des microbes déjà cités.

Au bout de trois semaines ou un mois, l'attaque est plus avancée, les peptones et les matières extractives diminuent, l'ammoniaque augmente ; les aérobies sont moins nombreux, les ferments mixtes ont fait place aux protéolytiques purs.

Après trois mois, la viande est devenue une masse noire visqueuse, ne dégageant plus d'odeur, ne contenant plus de peptones. Les isolements ne montrent plus que le *Micrococcus griseus non liquefaciens* comme aérobie, et les *Bacillus putrificus coli* et *Bacillus putridus gracilis* comme anaérobies. On peut considérer le processus comme terminé.

Avec des substances aussi complexes, l'intervention d'anaérobies doit donc être considérée comme nécessaire.

Il faut, en somme, reconnaître que si l'on a affaire à des substances moins complexes et, à plus forte raison, à des substances solubles comme les peptones, on ne peut pas nier les effets putrides déterminés par beaucoup d'aérobies : la forte odeur putride produite par le *Proteus vulgaris* dans certains milieux, celle que l'on trouve parfois aux cultures de *Colibacille* en sont la démonstration bien nette. Seulement, avec une même espèce, le phénomène est loin d'être constant et toujours aussi intense ; comme toutes les autres propriétés biologiques, il est sujet à des variations très grandes.

La phase ultime de la putréfaction bactérienne dure plus ou moins

(1) Tissier et Martelly, Recherches sur la putréfaction de la viande de boucherie (*Ann. de l'Inst. Pasteur*, XVI, 1902, p. 865).

longtemps, selon la résistance que la matière qui se putréfie offre à la solubilisation par les diastases sécrétées par les Bactéries. A ce moment, le liquide renferme une forte proportion d'hydrogène sulfuré, beaucoup de produits odorants, des ammoniaques composées entre autres. Peuvent apparaître alors des *Beggiatoa* blanches ou roses qui forment des flocons épais dans le liquide où fourmillent encore beaucoup de Bactéries. Dans cette phase terminale, la vie est bientôt peu active ; le liquide s'éclaircit lentement, les Sulfuraires disparaissent ; les rares formes bactériennes qu'il contient ne donnent plus de cultures dans les milieux ordinaires. C'est très probablement à ce moment que la nitrification se produit, après la disparition de toute matière organique. Tout d'un coup, après un long temps d'attente, il apparaît une abondante moisson d'Algues vertes, des types inférieurs, indiquant que la substance organique s'est enfin transformée en produits simples que la plante à chlorophylle peut assimiler, et à l'aide desquels elle peut bâtir des composés complexes, en apportant le carbone qu'elle emprunte à l'acide carbonique du milieu, reconstituant ainsi des corps doués d'une énergie latente, prêts à suffire aux besoins vitaux d'organismes élevés.

On saisit ainsi facilement le rôle considérable que les Bactéries remplissent dans la nature. C'est à elles qu'est échue la mission de rendre assimilables pour les plantes vertes, en les réduisant en composés simples, minéraux, les substances organiques qui ne peuvent plus servir aux organismes supérieurs, entre autres toutes celles qui ont perdu par usure l'énergie utilisable pour eux, et qui sont alors fixées sous des formes insolubles : tous leurs produits de déchet d'abord, l'urée par exemple, cette forme si importante de la désassimilation de la matière azotée chez les animaux, les résidus de la digestion, les cadavres des animaux, les détritus de toutes sortes des animaux ou des plantes. C'est à leur aide d'abord et ensuite à l'aide de l'énergie solaire, qui détermine la fonction chlorophyllienne, que les plantes reforment, avec ces matériaux, des albuminoïdes, des hydrocarbonés, des graisses. C'est aussi dans le même ordre d'idées que s'opèrent la destruction et la transformation de résidus et déchets nombreux de la vie et de l'activité humaine, question d'une si grande importance pour l'hygiène.

BACTÉRIES DE FERMENTATION

A l'origine, on désignait sous le nom de *fermentation* (de *fervere*, bouillir) les phénomènes de décomposition qui s'accompagnaient d'un abondant dégagement de gaz et d'un bouillonnement de la masse liquide. Le type en était la fermentation du moût de raisin. On en a rapproché plus tard des transformations sans dégagement gazeux visible, comme la fermentation acétique, produites, comme dans les premiers phénomènes, par la vie, aux dépens du milieu, d'organismes inférieurs divers. Enfin, on a également appliqué la même dénomination à des modifications de même ordre chimique que déterminent, sur des substances très diverses, certains produits de sécrétion d'êtres vivants, les diastases ou *ferments solubles* (1).

A vrai dire, il n'y a pas lieu de faire une distinction aussi catégorique

(1) Schutzenberger, Les fermentations. — Duclaux, Chimie biologique et Traité de microbiologie.

entre les fermentations produites directement par les organismes vivants et celles que déterminent les ferments solubles, cette dernière ne représentant que la seconde phase d'un seul et même phénomène, phase que l'on peut isoler dans le temps et dans l'espace. Dans les deux, l'être vivant est toujours véritablement en cause. La fermentation est un phénomène intimement lié à la nutrition de l'espèce et en rapport immédiat avec son activité vitale ; la vie de l'organisme ferment est la cause directe de telles modifications, qui s'affaiblissent ou cessent lorsque la vie de l'organisme s'amoindrit ou s'éteint.

Ce qui se passe dans toute fermentation, c'est un phénomène de simplification moléculaire portant principalement sur les substances hydrocarbonées et sur des substances azotées non albuminoïdes. La putréfaction est un phénomène de même ordre qui s'opère sur les matières albuminoïdes. Ces deux processus ont un but final identique, la dissolution et la désagrégation complète des composés complexes édifiés pour la vie des plantes ou des animaux et le retour des éléments organiques à des formes simples, composés oxygénés de l'azote, acide carbonique et eau.

Aussi la fermentation ne peut guère se séparer de la putréfaction. La fétidité des produits n'est qu'un caractère de minime importance ; d'ailleurs, il y a des fermentations très puantes et certainement des putréfactions sans grande odeur. La distinction paraît être basée simplement sur la qualité du résultat. Pour l'homme, une Bactérie est *ferment* lorsqu'elle peut lui fournir des produits directement utiles ; les espèces des putréfactions n'en sont pas encore arrivées là.

Les produits ultimes de la fermentation peuvent être très simples. Une matière ternaire, le sucre, l'alcool, peut être transformée en acide carbonique et en eau. C'est le cas le moins compliqué, que l'on ne considère même généralement pas comme fermentation, réservant ce nom aux réactions qui fournissent des composés plus complexes. Pour le physiologiste, ce doit être cependant le cycle complet du phénomène. Lorsque la Zooglée du *Bacillus aceti*, la *Mère de vinaigre*, a transformé en acide acétique tout l'alcool du milieu où on la cultive, elle s'attaque à l'acide acétique qu'elle peut brûler complètement, si elle n'a pas d'autres aliments à sa disposition. Mais il n'y a pas ici le critérium utilitaire ; ce n'est pas à proprement parler une fermentation, la modification a été conduite trop loin.

Les réactions qui forment la base des fermentations varient suivant l'espèce de Bactérie en jeu et suivant ses besoins.

Certaines espèces demandent, pour faire fermenter leur substratum, la présence de l'oxygène en abondance : il semble y avoir oxydation simple de la matière première. Ce sont les fermentations *par oxydation*.

Le *Bacillus aceti*, lorsqu'il se développe régulièrement, dans un liquide alcoolique approprié, oxyde l'alcool et le transforme en acide acétique.

Les *Bactéries nitrifiantes* du sol, au contact des bases ou des carbonates alcalins ou terreux, oxydent les composés ammoniacaux et les transforment en nitrites, puis en nitrates.

D'autres fois, l'oxygène n'est pas nécessaire ; il est même nuisible. L'espèce, qui est anaérobie, produit de l'hydrogène naissant, qui agit

comme réducteur sur le substratum. Ce sont des fermentations *par réduction.*

Le type en est la fermentation *butyrique*. Pasteur a montré que le *Bacillus butyricus*, son *Vibrion butyrique*, était un agent de la transformation de l'acide lactique et d'un grand nombre de composés ternaires, les sucres, les matières amylacées, la cellulose, en acide butyrique. La fermentation ne s'accomplit qu'à l'abri de l'air. Plusieurs autres espèces de Bactéries peuvent être ferments butyriques; quelques-unes même, véritables aérobies, produisent cette fermentation en présence de l'oxygène. Le *Bacillus violaceus*, abondant dans les eaux riches en matières organiques, peut donner de l'acide butyrique (1) dans certaines cultures à l'air. L'équation de la réaction est évidemment autre que dans le premier cas.

Dans les fermentations *par dédoublement*, la réaction paraît beaucoup plus simple; la molécule du produit initial se scinde exactement et donne deux molécules d'un autre produit. L'urée, soumise à l'action du *Micrococcus ureæ* et de quelques autres espèces, se dédouble en donnant du carbonate d'ammoniaque.

Pour ces différents cas, l'action de l'être vivant sur le substratum peut sembler directe, celle du *Bacillus aceti* sur l'alcool par exemple, ou ne se produire que par intermédiaire. Ainsi, l'urée subit la transformation en carbonate d'ammoniaque sous l'influence d'une diastase isolée par Musculus (2), que Pasteur et Joubert (3) ont montré être sécrétée par le *Micrococcus ureæ* et que Miquel (4) a retrouvée chez de nombreuses espèces. Il est probable qu'il doit en être ainsi dans tous les cas et que l'intervention de la diastase spéciale est nécessaire à tout processus de fermentation pour s'opérer.

On doit rapprocher certainement des fermentations la dissolution des matières albuminoïdes par les espèces qui forment des peptones à leurs dépens. C'est un stade de début de la putréfaction, encore un lien qui réunit ces deux phénomènes. Ces transformations sont causées par de nombreuses Bactéries, dont quelques-unes seulement sont suffisamment connues. Duclaux (5) a décrit dans une étude magistrale les modifications que des *Bacilles*, qu'il réunit sous la dénomination de *Tyrothrix*, font subir à la caséine du lait. Il serait grandement à souhaiter que de semblables recherches fussent entreprises. L'action des Bactéries sur les matières azotées fournirait sans doute des renseignements importants à la physiologie et à la pathologie.

L'action des *grains de kéfir* sur le lait est un bon exemple à citer. Nous avons vu précédemment que leur composition était complexe et chacune des parties constituantes concourt, dans la mesure de son activité physiologique propre, au but final. La Zooglée, d'aspect tout spécial, renferme deux espèces de Bactéries et une Levure, peut-être identique à la *Levure de bière*, le *Saccharomyces cerevisiæ*. L'une des Bactéries

(1) Macé, Sur quelques Bactéries des eaux de boisson (*Ann. d'hyg. publ. et de méd. lég.*, avril 1887).
(2) Musculus, *C. R. de l'Acad. des sc.*, 1876.
(3) Pasteur et Joubert, Sur la fermentation de l'urine (*Ibid.*, 1876).
(4) Miquel, Études sur la fermentation ammoniacale et sur les ferments de l'urée (*Ann. de micr.*, 1889 à 1896).
(5) Duclaux, Le lait. Paris, 1887, J.-B. Baillière.

est en courts bâtonnets, trapus, immobiles : c'est le *ferment lactique* de Pasteur, le *Bacillus lacticus* ; l'autre est de longs Bacilles lentement mobiles, présentant souvent deux légers renflements aux extrémités : c'est une espèce peut-être particulière, le *Bacillus caucasicus*. Le rôle de ces différents êtres est bien distinct. Le *Bacillus lacticus* sécrète de la présure qui coagule la caséine du lait, phénomène nécessaire pour sa transformation ultérieure, et de plus fournit une diastase particulière qui hydrate le lactose, le change en maltose, apte à subir la fermentation alcoolique que la Levure produit à ses dépens. Le *Bacillus caucasicus* dissout, à l'aide de la caséase qu'il produit, la caséine précipitée, la transforme en une albumose. Le lait, au début opaque et tenant en suspension des flocons de caséine précipitée, est bientôt transformé en liquide transparent, riche en peptones, légèrement acide et contenant une assez forte proportion d'acide carbonique et des traces d'alcool ; ces deux produits viennent de l'action de la Levure sur la matière sucrée.

Dans tous ces phénomènes, l'action exercée par l'être vivant, qui est ferment, est en grande disproportion avec son poids. Des quantités très petites du premier peuvent transformer une proportion relativement considérable de matière fermentescible. Ainsi Duclaux (1) calcule qu'une seule *Bactérie du vinaigre* détruit en vingt-quatre heures de 50 à 100 fois son poids d'alcool. C'est un des caractères essentiels des ferments.

Il est des fermentations produites par des microbes où l'on observe un notable dégagement de chaleur. Ce sont, par exemple, celles qui se produisent souvent dans le fumier frais, dans le foin humide, dans les cônes de houblon entassés ou dans le tabac mis en préparation. La température observée dépasse souvent 70°. Les espèces qui agissent, pouvant être dénommées *Bacilles thermogènes* (2), sont encore peu connues : nous avons vu (p. 97 ; Voy. aussi : *Bacilles thermophiles*) qu'un certain nombre d'espèces vivaient très bien à ces températures. Le phénomène serait probablement un phénomène d'oxydation. D'autres êtres, principalement des Moisissures, peuvent déterminer le même phénomène.

BACTÉRIES PATHOGÈNES

Parmi les nombreuses espèces de Bactéries répandues partout dans la nature, les unes, le plus grand nombre heureusement, semblent n'exercer aucune action nuisible sur les êtres vivants. Elles vivent aux dépens des matières organiques *mortes*, qu'elles solubilisent et transforment en partie à l'aide de leurs diastases. On leur a donné le nom de *Bactéries saprophytes* (σαπρός, putride ; φυτὸν, plante) (3). Beaucoup d'entre elles appartiennent aux groupes si connexes précédemment étudiés des Bactéries de putréfaction ou de fermentation.

D'autres peuvent, sous certaines conditions, s'implanter dans les organismes *vivants*, animaux ou plantes, où leur développement qui se fait à leurs dépens, constituant l'*infection* de l'organisme attaqué, détermine

(1) Duclaux. Chimie biologique.

(2) Cohn, Ueber thermogene Bakterien (*Berichte der deutschen bot. Gesellschaft*, 1893 p. 66).

(3) De Bary, Leçons sur les Bactéries, traduit par Wasserzug, 1886.

des troubles profonds, parfois mortels. Ce sont des *Bactéries parasites* ou *pathogènes*.

Il en est de ces dernières qui semblent ne pouvoir vivre que dans des hôtes de nature déterminée. Sorties de là pour une cause ou pour une autre, mort ou séparation de parties, elles tombent en vie latente ou meurent si elles n'ont pas à leur portée une voie nouvelle d'infection. Ce sont des *parasites obligés*. Le nombre en diminue tous les jours. On réussit, en effet, à faire vivre la plupart de ces espèces en saprophytes dans des milieux artificiels; il est dès lors probable que des faits analogues se passent dans la nature, plus ou moins facilement, suivant les conditions qu'ils exigent.

Les *parasites facultatifs*, au contraire, peuvent se développer et évoluer dans les milieux nutritifs non organisés, y vivre comme les espèces *saprophytes*, tout aussi bien que dans les hôtes où ils occasionnent des troubles spéciaux. Nous en trouverons de nombreux exemples. La Bactérie du choléra, celles de la fièvre typhoïde, du charbon, du tétanos, peuvent vivre dans les eaux potables, dans le sol, dans d'autres milieux naturels, où elles pullulent même par voie de division, y former aussi leurs spores et rester ainsi pendant un temps très long, attendant, pour exercer leurs ravages si terribles, qu'elles pénètrent dans les organismes attaquables par elles.

Il semble actuellement raisonnable de penser que le caractère pathogène de tels êtres n'est pas un caractère naturel, primaire, mais plutôt un caractère acquis, secondaire. Les types pathogènes seraient des saprophytes primitifs qui, par adaptations successives, auraient pris l'aptitude pathogène et graduellement acquis les caractères spéciaux, soit d'une façon exclusive, semble-t-il au moins actuellement, comme le *Bacille de la tuberculose*, le *Bacille de la lèpre*, le *Bacille de la morve* entre autres, que l'on ne connaît pas à l'état saprophytaire, soit d'une façon seulement partielle, comme le *Bacille du tétanos*, le *Colibacille*, les *Staphylocoques pyogènes*, par exemple, que l'on trouve tantôt en parasites chez les êtres vivants, tantôt en saprophytes dans le milieu extérieur. A l'appui de cette opinion, n'a-t-on pas vu le *Bacillus subtilis*, le *Bacillus mesentericus vulgaris*, considérés longtemps comme des saprophytes types, pouvoir acquérir des propriétés pathogènes par des moyens artificiels (1), et même rencontrés plus tard comme agents pathogènes naturels (2).

On trouve souvent, dans un organisme, des espèces qui s'y développent sans influencer d'une façon nuisible son fonctionnement. C'est ainsi qu'à l'état normal le tube intestinal de l'homme et des animaux renferme, dans ses différentes parties, un nombre assez considérable d'espèces, apportées probablement avec les aliments et les boissons. Elles trouvent dans l'intestin un milieu très favorable et s'y multiplient.

(1) CHARRIN et DE NITTIS, Un *Bacillus subtilis* pathogène (*Soc. de Biol.*, 1897, p. 711). — VINCENT, Sur les aptitudes pathogènes des microbes saprophytes (*Ann. de l'Inst. Pasteur*, XII, 1898, p. 785).

(2) SILBERSCHMIDT, Le *Bacillus subtilis* comme cause de la panophtalmie chez l'homme (*Ann. de l'Inst. Pasteur*, XVII, 1903, p. 268). — KAYSER, Zur Frage der Pathogenität des Bacillus subtilis, besonders für das Auge (*Centralbl. für Bakt.*, 1te Abth., Originale, XXXIII, 1903, p. 241). — SACQUÉPÉE, Infection secondaire par le *Bacillus mesentericus* au cours de la fièvre typhoïde (*Ann. de l'Inst. Pasteur*, XV, 1901, p. 261).

A proprement parler, ce ne sont pas des *parasites*, mais des *commensaux*. L'action de plusieurs de ces Bactéries n'est pas connue et passe tout à fait inaperçue. D'autres jouent un rôle dans la digestion en la renforçant à l'aide de leurs diastases : il est même à penser que la digestion de certaines substances, la cellulose, par exemple, doit être, en partie au moins, sinon entièrement, attribuée à cette *digestion bactérienne* qui s'ajoute à la digestion naturelle et se confond avec elle. De telles espèces peuvent plutôt être considérées comme directement *utiles* à l'organisme qui les contient ; c'est un véritable état de *symbiose* qui s'établit entre eux. Pasteur a même été jusqu'à dire que peut-être, sans ces Bactéries utiles, la nutrition et, par conséquent, la vie seraient impossibles ; c'est une question controversée aujourd'hui ; nous y reviendrons plus loin en traitant des Bactéries du corps et de l'intestin en particulier. Certaines, cependant, dans des conditions peu précisées encore, peuvent devenir nuisibles pour l'organisme à la suite d'une pullulation trop grande ou d'une action affaiblissante s'exerçant sur lui.

Parmi les maladies occasionnées par les Bactéries pathogènes, il en est qui semblent n'être jamais le résultat d'une infection naturelle, mais n'être provoquées chez les animaux qu'artificiellement, par l'expérimentation ; on les a réunies sous la dénomination de *maladies expérimentales* (1). Telles sont les septicémies obtenues par Coze et Feltz (2) à la suite d'inoculations, à des chiens ou des lapins, de liquides de putréfaction ; celles déterminées par Koch (3) sur les lapins et les souris par injection de sang putréfié. Telle était autrefois la septicémie de Pasteur, due au *Vibrion septique* ; il est maintenant démontré qu'une partie des accidents connus chez l'homme et les animaux sous les noms de *gangrène gazeuse*, *septicémie gangreneuse*, *œdème malin*, sont dus pour une bonne partie à cette espèce. Il en sera probablement de même dans la suite pour d'autres de ces affections décrites.

Dans ses études sur les fermentations, Pasteur a établi que, pour pouvoir affirmer en toute assurance qu'une Bactérie donnée est la cause réelle d'une réaction observée, il fallait l'observer pendant que le phénomène s'accomplissait, l'isoler en culture pure et enfin reproduire la réaction primitive en inoculant de ces cultures à un milieu nouveau dépourvu d'autres germes (4). Il a appliqué ces préceptes à l'étude des Bactéries pathogènes ; les conclusions ont été précisées et formulées par Koch dans la proposition suivante : Pour qu'une Bactérie puisse être considérée avec raison comme cause d'une maladie, il faut : 1° la trouver dans les tissus ou les liquides de l'organisme d'un individu malade ou d'un cadavre ; 2° l'isoler et en obtenir des cultures pures ; 3° reproduire la maladie par inoculation de cultures pures à des individus sains ; 4° retrouver la même espèce dans cette dernière expérience.

Les méthodes qui permettent de rechercher les Bactéries dans les tissus ou dans les liquides seront exposées en détail plus loin. L'obser-

(1) Cornil et Babès, Les Bactéries, 2e édit., 1886, p. 212.

(2) Coze et Feltz, Recherches chimiques et expérimentales sur les maladies infectieuses. Paris, 1872, J.-B. Baillière.

(3) Koch, Untersuchungen über die Aetiologie der Wundinfectionskrankheiten, 1878.

(4) Pasteur, Mémoire sur la fermentation appelée lactique (*C. R. de l'Acad. des sc.* XLV, 1879, p. 913).

vation est parfois très délicate. Les germes infectieux peuvent se localiser, ne se rencontrer qu'à certains endroits du corps et même ne pas se rencontrer ailleurs dans l'organisme. C'est ainsi que le *Bacille de la diphtérie* peut n'exister que dans la lésion locale qui est le plus souvent une fausse membrane, le *Bacille du tétanos* dans les environs de la plaie tétanique, qui est souvent minime. Bien plus, dans ces deux derniers cas, le microbe pathogène a parfois disparu au moment des recherches, les produits qu'il a formés continuant leur action ; on peut alors n'avoir que des résultats négatifs. Les parasites peuvent ne se montrer qu'à certains moments : le *Spirillum Obermeieri* n'apparaît dans le sang des malades atteints de *typhus récurrent* que pendant les accès ; c'est en vain qu'on le recherche dans les intervalles.

D'un autre côté, la présence constante d'une même Bactérie sur le cadavre ne suffit pas pour la considérer comme cause de l'affection ; on sait que le *Vibrion septique* se trouve souvent dans ces conditions peu de temps après la mort. Sa présence sur le vivant pendant la période d'état est d'une plus grande valeur ; elle ne suffit cependant pas ; les autres conditions sont nécessaires à obtenir. Le *Colibacille*, provenant de l'intestin, envahit encore plus vite l'organisme et a pu ainsi induire en erreur ; il est démontré que très peu de temps après la mort, avant même, pendant l'agonie, ce microbe peut traverser l'intestin, pénétrer dans la circulation et arriver rapidement dans les organes profonds (1). Beco (2), en soumettant des animaux à certaines intoxications, en usant particulièrement de substances qui irritent violemment l'intestin, comme l'émétique, a pu déterminer le passage du *Colibacille* dans le sang, chez l'animal en pleine vie.

C'est surtout la reproduction expérimentale de la maladie, au moyen de cultures pures, qui peut rendre affirmatif sur les rapports étiologiques soupçonnés.

La condition nécessaire pour que ces inoculations donnent des résultats estimables est d'employer des matières pures de tout germe étranger. S'il en existe, il peut se produire des complications gênantes ; leur action peut même se substituer entièrement à celle que l'on cherche à observer. Ainsi, si l'on injecte à un lapin du sang charbonneux putréfié, qui contient cependant une forte proportion de spores de *Bacillus anthracis*, ce n'est pas le *charbon* que l'on obtient le plus souvent, mais une *septicémie* à marche spéciale dont Charrin (3) a décrit une forme intéressante. Le développement de la *Bactérie septique* a été plus rapide que celui de la *Bactérie charbonneuse*, qui a dû disparaître ou, tout au moins, céder le pas.

La maladie que l'on veut reproduire doit être transmissible à l'espèce animale sur laquelle on expérimente. C'est une grave question qui n'est pas encore résolue pour bien des affections contagieuses. Certaines maladies de l'homme ne semblent pas, en effet, se transmettre aux animaux que l'on a cherché à infecter ; dans d'autres cas, l'agent virulent semble modifier son action et produire des troubles différents. On

(1) Achard et Phulpin, Envahissement des organes pendant l'agonie et après la mort (*Arch. de méd. expér.*, 1895).

(2) Beco, Étude sur la pénétration des microbes intestinaux dans la circulation générale pendant la vie (*Ann. de l'Inst. Pasteur*, IX, 1895, p. 199).

(3) Charrin, Sur une septicémie consécutive au charbon (*Soc. de Biol.*, 2 août 1884).

n'arrive quelquefois à un résultat qu'en changeant profondément les conditions physiologiques des individus sur lesquels on opère. Les oiseaux passaient pour réfractaires au charbon: Pasteur est parvenu à rendre facilement des poules charbonneuses en leur refroidissant les pattes avant ou après l'inoculation (1). Gibier (2) a pu faire périr du charbon, en les échauffant jusque vers 30°, des grenouilles et des lézards, qui avaient toujours été considérés comme indemnes. Il faut parfois modifier plus profondément l'organisme à infecter, créer de véritables prédispositions morbides, pour permettre à la Bactérie inoculée de s'implanter et de croître. Nicati et Rietsch (3) ont réussi à déterminer le choléra chez des cobayes en injectant d'une culture pure directement dans le duodénum ; c'est l'irritation intestinale produite qui était le principal adjuvant. Koch (4) a obtenu le même résultat en injectant de fortes doses de teinture d'opium dans la cavité abdominale et paralysant ainsi l'intestin, pour permettre aux *Bacilles virgules* de séjourner plus longtemps dans son intérieur. D'autres produits, l'acide lactique pour le virus du charbon symptomatique, d'après Nocard et Roux, des toxines microbiennes pour d'autres, ou même de simples contusions, des meurtrissures, peuvent agir dans le même sens. Il peut suffire de changer la réaction des liquides de l'organisme en les alcalinisant ; acides, ils s'opposent au développement des Bactéries.

Les autopsies doivent être pratiquées au plus tôt, pour éviter l'envahissement par des espèces étrangères.

Les Bactéries saprophytes vraies, sauf des conditions particulières expliquant les particularités citées plus haut (p. 121), semblent n'avoir aucune action nuisible sur l'organisme. Wyssokowitsch a pu injecter des doses considérables de différentes espèces saprophytes dans les veines de lapins, cobayes, chiens, sans produire de troubles appréciables (5). Ces recherches ont été pleinement confirmées par celles de Banti (6). Bien qu'introduites en quantité énorme, elles disparaissent du sang en quelques heures; le foie, la rate, la moelle des os en renferment encore, alors que le sang n'en contient plus; vingt-quatre heures après une injection massive de *Bacillus subtilis*, on n'en trouve plus nulle part, dans le cas où la culture ne contenait que des cellules végétatives ; s'il y avait des spores, on peut en retrouver de vivantes dans le foie ou la moelle des os, jusque plusieurs mois après l'expérience.

Les Bactéries pathogènes, introduites à doses modérées, se raréfient d'abord, disparaissent du sang, reparaissent au bout de quelque temps, puis augmentent jusqu'à la mort. D'après les recherches de Fodor (7), les Bactéries du charbon ne se retrouvent plus dans le sang quatre heures après l'injection ; le sang n'est ni fertile, ni contagieux ; elles sont pour ainsi dire immobilisées dans les viscères, où elles se multi-

(1) Pasteur, Étiologie du charbon (*Bull. de l'Acad. de méd.*, 1879, p. 1152).

(2) Gibier, *in* Cornil et Babès, Les Bactéries, 3e éd., t. II, p. 214.

(3) Nicati et Rietsch, Recherches sur le choléra (*Arch. de physiol.*, 1885, n° 5).

(4) Koch, Conférences sur le choléra, 1884 et 1885.

(5) Wyssokowitsch, Ueber die Schicksale der in's Blut injectiren Microorganismen im Korper der Warmblüter (*Zeitschr. für Hygiene*, t. I, 1, 1886).

(6) Banti, Sulla distribuzione dei batteri nell'organismo (*Arch. per le sc. med.*, 1888, XIII).

(7) Fodor, Neue Versuche mit Injection von Bacterien in die Venen (*Deutsc Wochenschr.*, 1886, p. 617).

plient et reparaissent dans le sang de vingt à cinquante-quatre heures après l'opération, pour s'y développer et causer rapidement la mort.

Les recherches précitées de Banti semblent prouver qu'au début, alors que l'on n'en retrouve plus dans le sang, elles se concentrent dans les lymphatiques.

D'après Trapeznikoff (1), les spores de Bactéries pathogènes, introduites dans l'organisme, saisies par les leucocytes avant leur développement, se conservent souvent très longtemps vivantes et virulentes dans les leucocytes non altérés. Elles peuvent être ainsi transportées et emmagasinées en quelque sorte dans les organes profonds. Dès que la vitalité du leucocyte diminue ou disparaît, ces spores germent. On verra plus loin que la phagocytose donne une explication très satisfaisante de ces faits.

Nous avons vu précédemment (p. 57 et suiv.) que les Bactéries agissaient sur les milieux aux dépens desquels elles vivent, surtout par l'action de produits particuliers qu'elles forment pendant leur évolution, produits de sécrétion ou d'excrétion; nous savons que ces produits contribuent pour une large part ou pour la totalité à leur action physiologique. Ceci est surtout vrai pour les Bactéries pathogènes.

On a beaucoup discuté sur la manière d'agir des Bactéries pathogènes; diverses théories ont successivement pris place dans l'opinion. Les premières, il faut le reconnaître, étaient plutôt de simples vues de l'esprit. C'est ainsi que la *Bactéridie charbonneuse* paraissait nuire en détournant l'oxygène ou en provoquant des embolies capillaires ; d'autres en absorbant des substances alimentaires dont elles privaient ainsi les cellules. L'idée qu'on s'en fait aujourd'hui est surtout basée sur l'expérimentation et semble la vraie. L'expérience démontre, en effet, que beaucoup de Bactéries pathogènes produisent des substances qui, introduites dans l'organisme séparément des microbes, déterminent les mêmes effets que ces derniers, ou au moins les effets typiques observés à la suite de l'envahissement de l'organisme par ces microbes. On tend à penser actuellement que la majeure partie des Bactéries pathogènes, sinon toutes, produisent de ces substances toxiques, de ces *toxines*, ce qui a substitué la notion d'intoxication par ces produits à la notion de l'action directe du microbe sur les éléments ou les liquides de l'organisme. Ce qui se passe dans la diphtérie ou le tétanos est un des meilleurs exemples à citer à l'appui. Là, en effet, le microbe ne se trouve que dans un point bien limité de l'organisme attaqué, la fausse membrane pour la diphtérie, souvent une bien petite plaie pour le tétanos; il s'y cantonne exclusivement, et, comme il produit des phénomènes généraux d'intoxication, ce ne peut être que par suite de la diffusion de substances toxiques formées au lieu où il se trouve, substances qui, emportées par la voie sanguine, vont agir sur les différents systèmes.

Nous avons vu (p. 64 et suiv.) que ces produits nocifs des Bactéries sont de deux sortes, des produits alcaloïdiques, les *ptomaïnes*, et des composés d'un autre groupe, que leur composition, leurs propriétés

(1) Trapeznikoff, Du sort des spores de microbes dans l'organisme animal (*Ann. de l'Inst. Pasteur*, 1891).

font regarder comme des matières albuminoïdes, les *toxoprotéines* et les *toxalbumines*, désignées souvent sous le nom plus général et moins précis de *toxines*. Nous savons que ces dernières, par certains de leurs caractères, surtout leur précipitation par l'alcool, leur adhérence aux précipités, leur resolubilisation dans l'eau, leurs modifications par l'air, la lumière, la chaleur, les effets considérables qu'elles produisent à doses excessivement minimes, se rapprochent des diastases et peuvent être considérées comme appartenant au même groupe. Ce qui vient aussi à l'appui du rôle qu'on veut leur faire jouer aujourd'hui, c'est que certains de ces produits, comme le prouvent les recherches de Bouchard (1), de Griffiths (2) principalement, se trouvent tout à la fois dans les milieux de culture où vit l'espèce pathogène étudiée et dans les émonctoires, l'urine surtout, des malades atteints de l'affection causée par le microbe.

Si les recherches sur l'action physiologique de ces toxines sont encore loin d'être menées à bonne fin, il faut reconnaître qu'elles ont déjà fourni nombre de faits intéressants, jetant une vive lumière sur l'action des microbes pathogènes. Ces recherches physiologiques sont, au point de vue qui nous occupe, d'une importance considérable ; après les nombreux travaux qu'elles ont déjà suscités, la voie est encore largement ouverte à l'expérimentation. Les faits mis en lumière par bien des chercheurs, Bouchard, Arloing, Charrin, Roger, Courmont et Doyon, principalement, donnent des indications précieuses. Ils démontrent que les toxines provoquent des modifications importantes dans la circulation du sang ou de la lymphe ; ils prouvent leur influence sur le système nerveux, cérébral ou médullaire, leurs effets sur la nutrition générale, sur les sécrétions diverses, sur la fibre musculaire, ce qui donne l'explication de bien des particularités des infections. Rien que l'action de certaines toxines sur le système vaso-moteur, démontrée par Bouchard, Charrin (3) et Gley, permet d'expliquer avec toute satisfaction des phénomènes si souvent observés, les congestions, les anémies, l'œdème, surtout la diapédèse, que nous verrons plus loin si importante pour la défense de l'organisme, les hémorragies, si fréquentes dans la peau dans beaucoup d'infections provoquant des taches rosées, de l'érythème, du purpura, des pétéchies.

On ne sait que bien peu de choses au sujet de la production de ces toxines ; il est des conditions qui leur sont favorables, d'autres qui leur sont contraires. Guinochet (4) a démontré qu'elles ne provenaient pas nécessairement des albuminoïdes du milieu, mais pouvaient être formées, par synthèse, aux dépens de corps plus simples ; cette synthèse doit s'opérer dans le protoplasme de l'élément microbien.

A ce même point de vue, la question de la voie d'introduction, de diffusion des toxines dans l'organisme, se montre importante. Les recherches de Bouchard, de Gamaléia, de Charrin démontrent que la *porte d'entrée* influence d'une façon très notable la toxicité de beaucoup de produits microbiens. L'organisme possède de véritables protections

(1) Bouchard, Cours de pathologie générale, 1888.
(2) Griffiths, Les ptomaïnes dans quelques maladies infectieuses (*C. R. de l'Acad. des sc.*, CXIV, 1892, p. 496).
(3) Charrin, La maladie pyocyanique, 1889.
(4) Guinochet, Sur la toxine du Bacille de la diphtérie (*Soc. de Biol.*, 28 ma 1892).

naturelles contre ces poisons ; c'est ce qui fait qu'une voie peut être plus favorable qu'une autre ou inversement. Ainsi, l'intestin modifie ou détruit même la plupart du temps ces toxines ; le suc gastrique et le suc pancréatique paraissent surtout être actifs (1) ; il y a peut-être lieu de faire intervenir l'action des microbes intestinaux (2). La voie vasculaire, au contraire, est très favorable à la production de leurs effets toxiques, elle peut même les aggraver.

De plus, les toxines n'agissent pas immédiatement comme un poison ; il y a souvent, au contraire, dans leur action, une véritable *incubation*, ce qui peut faire penser que la substance active provoque, dans l'organisme, des dédoublements portant probablement sur des substances albuminoïdes qui donneraient seulement les vrais agents toxiques (Sidney, Martin).

Les principes sécrétés par les Bactéries ne convergent pas tous vers un but unique, favoriser le microbe, produire les effets typiques de l'infection. Les travaux de Bouchard, Arloing, Roux, Chamberland, Yersin, Vaillard ont démontré qu'à côté des toxines, produits nuisibles pour l'organisme, il pouvait s'en trouver d'autres à action contraire, favorables à l'organisme, les *produits vaccinants*, de même origine microbienne que les premiers, de même nature qu'eux probablement, bien qu'on n'ait encore que peu de certain à ce sujet. Nous retrouverons plus loin ces produits vaccinants en parlant de l'immunité et de la vaccination.

Les recherches d'Arloing, Courmont et Rodet, Roger démontrent qu'il existe une troisième classe de produits sécrétés par les microbes, agissant comme les premières toxines dans un sens favorable au microbe, en imprimant à l'organisme dans lequel ils sont introduits une véritable prédisposition à l'invasion par ce microbe. Ces *produits solubles prédisposants* (3) n'ont pas par eux-mêmes d'action nuisible bien marquée, ce qui les distingue d'emblée des toxines, mais ils préparent l'organisme à subir l'effet des produits toxiques du même microbe ou l'y rendent beaucoup plus sensible. Les *antiphagines* et les *aggressines*, dont il sera question plus loin, doivent rentrer dans cette catégorie. Parfois l'introduction simultanée des deux sortes de produits, toxines et substances prédisposantes, ne détermine pas d'effets marqués ; il faut aux produits prédisposants un certain temps pour influencer l'organisme, leur action est alors durable ; c'est ce que Courmont a observé pour le *Bacille de la tuberculose*, le *Staphylocoque pyogène*, le *Streptocoque pyogène*. D'autres fois, leur action est immédiate, mais passagère : chez le *Bacille pyocyanique*, le *Bacille du charbon symptomatique*, par exemple.

Ces produits prédisposants peuvent agir en s'opposant à la diapédèse et, par conséquent, à la phagocytose, comme Charrin et Gley l'ont prouvé pour le *Bacille pyocyanique* ; ou, au contraire, en excitant le

(1) CARRIÈRE, Étude expérimentale sur le sort des toxines et des antitoxines introduites dans le tube digestif des animaux (*Ann. de l'Inst. Pasteur*, XIII, 1899, p. 435). — NENCKI, SIEBER et SCHOUMOW-SIMANOWSKI, Die Entgiftung der Toxine durch Verdauungssäfte (*Centralbl. für Bakt.*, XXIII, 1898, p. 840 et 880). — WEHRMANN, Contribution à l'étude du venin des serpents (*Ann. de l'Inst. Pasteur*, XII, 1898, p. 510).

(2) CHARRIN et LEVADITI, Modifications des toxines introduites dans le tube digestif (*C. R. de l'Acad. des sc.*, 9 janvier 1899).

(3) COURMONT, Étude sur les substances solubles prédisposant à l'action pathogène de leurs microbes producteurs (*Revue de méd.*, 1891, p. 842).

système vaso-dilatateur, attirant les leucocytes, en un point où se forme alors un abcès, comme Arloing le remarque avec le *Staphylocoque pyogène*. Nous retrouverons encore une autre explication de cette action des produits prédisposants en parlant de la *chimiotaxie*.

On connaît bien peu de choses sur les conditions de formation de ces produits vaccinants ou prédisposants. Leur production semble être en rapports intimes avec les conditions de vie du microbe. Ainsi, d'après Courmont, le *Bacille de la tuberculose* fabrique des produits vaccinants et prédisposants ; les premiers domineraient dans les cultures, les seconds seraient plus abondants dans l'organisme infecté.

Il est cependant des espèces où, jusqu'ici, on n'est pas encore parvenu à découvrir la formation de tels produits actifs, toxiques ou autres : elles paraissent n'agir que d'une façon mécanique, en provoquant peut-être simplement par leur présence une irritation des tissus. C'est ce qui ressort des travaux de Kotliar et de Rénon (1) sur une Moisissure pathogène, l'*Aspergillus fumigatus*, cause d'une pseudo-tuberculose ; c'est ce qui paraît admissible pour certains *Cladothrix*, pour l'*Actinomyces*, pour prendre des exemples parmi les Bactéries. L'action produite peut être due à une dénutrition provoquée par la soustraction de principes nutritifs ou d'oxygène, ou à une simple irritation, aboutissant à une prolifération de certains éléments cellulaires, à la formation de néoplasies, comme dans les lésions de l'*Actinomycose*, que l'on a longtemps considérées comme une variété de sarcome.

L'organisme, dans l'infection, est loin de se laisser envahir comme un milieu inerte, une culture ; il se défend, au contraire, de son mieux ; il y a lutte véritable entre les cellules et les Bactéries (2). Souvent, c'est le parasite qui cède, il y a guérison ; quand il l'emporte, il y a maladie et parfois mort.

Pasteur et son école voyaient dans la victoire de l'organisme envahi le résultat de sa *résistance vitale*, ou d'une non-appropriation du terrain au développement du germe ensemencé.

En réalité, la *défense de l'organisme* consiste essentiellement dans la mise en jeu d'activités fonctionnelles qui lui sont propres. Parmi ces activités, la plupart sont des propriétés générales, véritables *fonctions de défense* employées par l'organisme pour résister à toute cause nocive, de quelque nature qu'elle soit, corps étranger nuisible, toxique chimique, virus non vivant, aussi bien qu'être vivant. D'autres paraissent dirigées directement contre l'action microbienne elle-même et ne se forment dès lors que sous l'influence de la présence du microbe ou de ses produits. Dans le premier cas, ce qui apparaît de suite comme important, c'est la mise en jeu directe des éléments cellulaires vivants eux-mêmes ; dans le second, c'est l'action de produits particuliers qui peuvent être considérés comme de véritables *sécrétions de défense*. Il est vrai qu'il existe entre les deux phénomènes un lien intime, ces sécrétions provenant des mêmes éléments cellulaires qui interviennent directement en premier, auxquels on doit donc rapporter l'action fondamentale. On a, suivant le cas, attribué plus ou moins d'importance à ces facteurs.

(1) Rénon, Aspergillose intestinale (*Soc. de Biol.*, 11 janvier 1896).
(2) Virchow, Der Kampf der Zellen und Bacterien (*Virchow's Arch.*, CI).

PHAGOCYTOSE.

Pour Metschnikoff (1), le rôle de la défense de tout organisme est dévolu aux éléments cellulaires capables d'englober des solides. Il les nomme *phagocytes*, cellules dévorantes ; l'ensemble de cette fonction est la *phagocytose*. Deux espèces de cellules ont cette propriété. Ce sont d'abord les cellules capables de migration, les globules blancs, les leucocytes à noyau multiple ou lobé, les *microphages*, comme il les nomme. Les *macrophages* sont des éléments fixes, n'émigrant pas à la recherche des Bactéries à absorber comme les précédents, mais les consommant sur place lorsqu'elles arrivent à leur contact. Telles sont les cellules de la rate, les cellules épithéliales des alvéoles pulmonaires, les cellules fixes du tissu conjonctif. Il y a du reste des états transitoires entre ces deux catégories de phagocytes. Les éléments phagocytaires de beaucoup les plus importants sont les leucocytes ; ce sont les agents les plus efficaces de la défense de l'organisme. Le mécanisme ne vise pas spécialement les Bactéries, en comprenant même avec elles des microbes d'autre nature, mais est beaucoup plus général, s'appliquant, avec les mêmes caractères généraux, à des produits ou éléments nocifs très divers, éléments vivants étrangers, globules du sang ou autres par exemple, corps solides variés, même poisons minéraux ou organiques : partout, les processus de défense mis en œuvre sont identiques. Ce qui se passe est facile à constater. Les phagocytes se rassemblent autour des Bactéries et aussi bien de tout corps étranger introduit dans l'économie. Si le corps est volumineux et inattaquable par eux, ils l'entourent, par transformation directe, d'une membrane conjonctive isolante qui se trouve constamment. S'ils ont affaire à des Bactéries, ils les absorbent, parfois en quantité telle que certains en paraissent remplis. Les microbes englobés changent d'aspect, perdent leur aptitude à fixer les couleurs, meurent et se divisent en fragments irréguliers, après un séjour quelque peu prolongé ; ils sont *digérés* par les phagocytes. Lorsque ceux-ci réussissent à absorber la totalité des premiers, l'organisme l'emporte ; s'ils ne peuvent y arriver, il est vaincu.

Le fait essentiel de beaucoup le plus important est ici la sortie des globules blancs des espaces où ils sont naturellement enfermés. C'est une diapédèse pathologique, une leucocytose provoquée par l'irritation des tissus où elle s'opère (2). Cette irritation peut être causée par la seule présence de l'agent infectieux ; ou les produits solubles qu'il sécrète déterminent ou favorisent la diapédèse par leur action vaso-dilatatrice.

La plupart des globules blancs paraissent posséder à un haut degré ce pouvoir phagocytaire ; on l'observe surtout chez les leucocytes à noyaux polymorphes dits polynucléaires neutrophiles et les leucocytes mononucléaires. Les leucocytes éosinophiles et les cellules basophiles d'Ehrlich n'ont, au contraire, semble-t-il, aucune action. Les leucocytes mononucléaires, cependant, n'englobent ni les *Streptocoques de l'érysipèle*, ni les *Gonocoques* qu'englobent facilement les neutrophiles ;

(1) METSCHNIKOFF, Ueber die Beziehung der Phagocyten zu Milzbrandbacillen (*Virchow's Arch.*, 1884, p. 502). — Théorie des phagocytes (*Ann. de l'Inst. Pasteur*, I, 1887, n° 7, p. 321). — L'immunité dans les maladies infectieuses, 1901.

(2) BOUCHARD, Essai d'une théorie de l'infection (*Congrès de Berlin*, 1890).

d'un autre côté, les *Bacilles de la lèpre* ne sont jamais pris par les neutrophiles, facilement, au contraire, par les mononucléaires.

Lorsque, pour une cause quelconque, cette diapédèse et cette action phagocytaire sont entravées, la résistance de l'organisme est vaincue, il peut être envahi par le microbe. Cette action contraire peut provenir des conditions du milieu extérieur ; c'est probablement ainsi que le froid est une véritable cause déterminante de certaines maladies infectieuses, pneumonie, pleurésie par exemple, dont il n'introduit pourtant pas le microbe dans l'organisme. L'agent infectieux existe là, très souvent, à l'état normal, à la surface de la muqueuse respiratoire, arrêté par les cellules épithéliales d'abord, puis, s'il parvient à les traverser, par les nombreux éléments lymphatiques de la couche sous-muqueuse ; le froid n'a qu'à troubler la série des actes de ces éléments pour qu'ils ne suffisent plus à leur rôle de protection. Cette même action peut en outre être provoquée par des sécrétions mêmes de la Bactérie. C'est ce que démontre l'aggravation de la maladie, reconnue par Bouchard pour le charbon, la maladie pyocyanique, l'infection purulente, le choléra des poules, après injection de produits solubles des cultures de ces microbes à des animaux inoculés antérieurement. Des expériences de Charrin et Gley (1), il ressort que ces produits solubles, pour le *Bacille du pus bleu*, entravent la diapédèse en paralysant les nerfs vaso-dilatateurs ; la diapédèse, nécessitant une dilatation vasculaire active, ne peut plus se produire.

Un effet analogue peut être produit, pour une maladie donnée, par des produits de sécrétion de Bactéries autres que celle qui la détermine, voire même par des espèces ordinairement inoffensives. C'est ainsi que Roger a observé que l'injection de produits solubles du *Micrococcus prodigiosus* rendait possible, chez le lapin, le développement du charbon symptomatique, auquel il est réfractaire dans les conditions ordinaires ; Monti (2) a observé des faits semblables pour d'autres espèces pathogènes. Le même résultat peut être obtenu avec des substances chimiques ou médicamenteuses agissant dans le même sens sur la diapédèse ; ce sont des indications qui peuvent être utilisées dans la thérapeutique des maladies infectieuses.

Ce qui peut renseigner peut-être sur la façon dont se passe le phénomène de l'afflux des leucocytes aux endroits où leur présence est nécessaire, c'est une curieuse propriété de ces éléments, mise en lumière par Pfeiffer (3), qui lui a donné le nom de *chimiotaxie*. Les leucocytes, comme le font du reste un grand nombre d'organismes inférieurs unicellulaires végétaux et animaux, possèdent une propriété spéciale, sorte d'attraction qui se manifeste par leur mouvement vers certaines substances exerçant sur eux une action probablement chimique, encore indéterminée : c'est la *chimiotaxie positive*. D'autres substances, au contraire, exercent sur ces mêmes éléments une véritable action répulsive qui les fait chercher à s'en éloigner : c'est la *chimiotaxie négative*.

(1) Charrin et Gley, *in* Charrin, La maladie pyocyanique, 1889.

(2) Monti, Influenza dei prodotti tossici dei saprofyti sulla restifuzione della virulenza ai microparassiti attenuati (*Acc. dei Lincei*, 1889, II, n° 7).

(3) Pfeiffer, Ueber chemotactische Bewegung von Bacterien, Flagellaten und Volvocinen (*Unters. a. d. bot. Inst. in Tubingen*, 1887, p. 582).

Cette chimiotaxie est une propriété que semble posséder, du reste, tout être ou tout élément vivant. C'est elle qui attire, par exemple, autour d'Algues mortes dans l'eau, des espèces déterminées d'êtres inférieurs que l'on voit ainsi s'amasser autour d'elles. Les Bactéries elles-mêmes sont chimiotaxiques ; nous en avons déjà eu une preuve très nette précédemment (p. 13), en voyant qu'elles étaient rapidement attirées par l'oxygène. Ali Cohen (1) a même proposé d'utiliser cette propriété dans la recherche de certaines espèces dans un mélange : celles qui sont particulièrement attirées par certaines substances se condensent autour d'elles ; c'est ainsi que le suc de pomme de terre riche en potasse et en asparagine, substances douées de chimiotaxie positive à un haut degré, attire surtout, dans un mélange, les *Bacilles typhiques* et les *Spirilles du choléra*.

Les leucocytes sont tous spécialement attirés par les produits solubles sécrétés par certaines Bactéries pathogènes, qui se nuisent ainsi directement à elles-mêmes en favorisant à un haut point la diapédèse et, conséquemment, la phagocytose. C'est ce qu'ont démontré Massart et Bordet (2), dans des recherches très originales. Ils se servent de tubes capillaires fermés à une extrémité et contenant des cultures pures de Bactéries pathogènes, qu'ils placent dans la cavité abdominale de grenouilles où ils les laissent séjourner vingt-quatre heures. Ces tubes déterminent autour d'eux et à leur intérieur un appel considérable de leucocytes, s'appliquant surtout contre la paroi interne, formant même parfois de si gros amas qu'ils obturent complètement la lumière du tube. Cet afflux rapide des leucocytes est empêché par l'anesthésie qui arrête la diapédèse. Les auteurs cités ont expérimenté sur le *Micrococcus pyogenes albus*, le *Bacille du choléra des poules*, le *Bacille typhique*, le *Bacille du charbon*, qui ont donné des résultats évidents.

Gabritchevsky (3) a obtenu de semblables résultats avec le lapin. La plupart des cultures bactériennes ont manifesté de la chimiotaxie positive. Il en faut conclure que les Bactéries sont des excitants spécifiques des leucocytes, qui sont attirés à grande distance par la diffusion de très petites quantités de produits solubles sécrétés par elles. C'est un des facteurs puissants de la phagocytose.

Cette théorie des phagocytes, très simple, est basée sur des faits d'observation indéniables, l'absorption et la destruction des Bactéries par certaines cellules, particulièrement les éléments amiboïdes. La destruction serait une véritable digestion, qui, d'après Metschnikoff, s'opérerait sous l'influence de ferments sécrétés par les éléments phagocytes, des *cytases*, *macrocytase* ou *microcytase* suivant le cas.

La fonction phagocytaire existe d'ailleurs dans toute la série animale : chez les êtres unicellulaires, les Protozoaires, elle est dévolue à la cellule entière ; chez les êtres plus élevés, elle se localise dans certains éléments ou certains tissus ; chez les Vertébrés, elle n'appartient plus guère qu'aux leucocytes.

(1) Ali Cohen, Die Chemotaxis als Hülfsmittel der bacteriologischen Forschung (*Centralbl. für Bakt.*, VIII, 1882, p. 161).

(2) Massart et Bordet, Recherches sur l'irritabilité des leucocytes (*Soc. roy. des sc. nat. et méd. de Bruxelles*, 1890).

(3) Gabritchevsky, Sur les propriétés chimiotaxiques des leucocytes (*Ann. de l'Inst. Pasteur*, 1890, p. 346).

Pouvoir bactéricide des humeurs.

En face de cette théorie de l'action des phagocytes, en opposition même avec elle, on veut expliquer la défense de l'organisme contre l'infection sans un concours réellement actif des cellules vivantes, mais surtout par la simple formation de produits qui s'opposent à l'invasion microbienne, en agissant sur les microbes eux-mêmes ou sur les substances nuisibles qu'ils élaborent. Ce sont ici les liquides de l'organisme qui interviennent, d'où le nom de *théorie humorale* qui a été appliqué.

Ces produits formés en vue de la défense seraient multiples, du moins d'après ce que pensent beaucoup d'observateurs. Pour d'autres, les modalités d'action seules varieraient suivant les conditions particulières ; la réaction fondamentale de l'organisme serait une, ou tout au moins peu compliquée. C'est plutôt à cette dernière conception qu'il paraît rationnel de s'attacher.

Les humeurs possèdent, les plus importantes au moins, le sang et le sérum sanguin principalement, des *propriétés bactéricides* très marquées et sont capables de tuer, de détruire une grande quantité de microbes infectieux.

Fodor (1) a signalé le premier, en 1886, l'action bactéricide du sang, en montrant que les microbes saprophytes, *Bacillus subtilis*, *Bacillus megaterium*, *Bacterium termo*, injectés dans les veines en très grandes quantités, disparaissent vite du sang sans qu'on puisse en trouver dans les phagocytes ; ils ne peuvent donc être tués que par le sang même. Pour les espèces pathogènes, comme on l'a vu précédemment (p. 124), il y a aussi d'abord une disparition du sang, due à la mort d'un grand nombre de microbes, mais, quand leur nombre est suffisamment grand, il en persiste dans certains viscères qui produisent plus tard l'infection générale. A la suite d'autres expériences, il a pu constater, avec du sang fraîchement retiré d'un animal sain, la mort *in vitro* du *Bacille du charbon* et reconnu que cette mort ne pouvait être due qu'à un processus biochimique.

Il remarque en outre que le sang artériel a une activité bactéricide plus marquée que le sang veineux ; que l'action bactéricide augmente avec la température, présente un optimum vers 38°-40°, puis diminue rapidement au-dessus ; qu'elle ne varie pas quand on a extrait du sang les gaz qu'il contient, mais diminue dans une atmosphère d'oxygène et d'acide carbonique et manque complètement au sang de lapins empoisonnés avec l'oxyde de carbone. De plus, fait important, il trouve que l'alcalinisation du sang augmente notablement ses qualités bactéricides.

(1) Fodor, Bacterien im Blute lebender Thiere (*Arch. für Hygiene*, IV, 1886, p. 129). — Neuere Versuche mit Injection von Bacterien im die Venen (*Deutsche med. Wochenschr.*, 1886, n° 36). — Die Fähigkeit des Blutes Bacterien zu vernichten (*Ibid.*, 1887, n° 34). — Neuere Untersuchungen über die bakterientödtende Wirkung des Blutes und über Immunisation (*Centralbl. für Bakt.*, VII, 1890, p. 753). — Ueber die Alkalizität des Blutes und Infektion (*Congrès d'hygiène de Budapest*, 1894). — Fodor et Rigler, Neuere Untersuchungen über die Alkalizität des Blutes (*Centralbl. für Bakt.*, 2te Abth., XXI, 1897, p. 134). — Rigler, Das Schwanken der Alkalicität des Gesamtblutes und des Blutserums bei verschiedenen gesunden und kranken Zuständen (*Ibid.*, XXX, 1901, p. 823).

Parmi les sels dont l'injection exalte surtout cette propriété, se trouvent en première ligne le carbonate de soude et le phosphate de soude, à la dose de 3 à 5 grammes pour le lapin ; après, à la même dose, mais moins actifs, le chlorure de sodium et le carbonate d'ammonium. Nuttall (1) a confirmé cette découverte dans des expériences instituées pour étudier l'action des globules blancs sur les Bactéries, particulièrement au point de vue de la phagocytose. Il a constaté qu'avant d'être attaquées par les phagocytes, les Bactéries ont déjà subi une altération manifeste sous l'influence des liquides de l'organisme. Pour lui, c'est à ces liquides, sang et lymphe surtout, qu'il faut attribuer le rôle principal dans la défense de l'organisme contre l'invasion des Bactéries.

Büchner (2), reprenant les expériences de Nuttall, en confirme les résultats et signale des points nouveaux d'un haut intérêt. En opérant sur du sang de lapin et de chien, il ensemence de ce liquide, recueilli aseptiquement et défibriné par agitation avec de petites perles de verre, avec du *Bacille du charbon* ou du *Bacille du rouget du porc* ; puis il fait des numérations au moyen de cultures sur plaques, aussitôt après l'ensemencement d'abord, puis quelque temps après, à des moments divers. Les Bactéries diminuent rapidement, surtout lorsque la dose ensemencée n'est pas très grande. Avec le *Bacille du charbon*, dans une expérience la première numération, faite aussitôt après l'ensemencement, donne sur la plaque un total de 2678 colonies ; une deuxième numération, faite dans les mêmes conditions deux heures après, n'en donne plus que 36 ; une troisième, faite après cinq heures et demie, n'en donne plus que 6. Lorsque la quantité de Bactéries ensemencées est beaucoup plus forte, on observe quand même une diminution, mais moindre ; de plus, le chiffre s'élève vite. Dans une observation, la numération faite aussitôt l'ensemencement donne 15105 colonies ; une deuxième, après deux heures, 492 ; la troisième, après cinq heures et demie, 931. La température influe rapidement sur cette action bactéricide ; du sang chauffé pendant une heure à 55° perd toute action. L'âge du sang hors de l'organisme influe moins ; du sang conservé pendant sept jours à une température basse de 6°-8° ne perd pas sa propriété bactéricide, mais devient moins actif.

Pour Büchner (3), il existerait donc réellement dans le sang une substance possédant des propriétés bactéricides marquées ; il lui a donné le nom d'*alexine*.

Le pouvoir bactéricide que peuvent posséder certaines humeurs se reconnaît d'une façon particulièrement nette dans la réaction bien connue sous le nom de *phénomène de Pfeiffer*. En injectant d'une culture de *Vibrion cholérique* bien actif dans le péritoine de cobayes préalablement immunisés contre le choléra, Pfeiffer (4) a vu les microbes devenir rapidement immobiles, se transformer en petites masses arrondies, granu-

(1) Nuttall, Experimente über die bacterienfeindlichen Einfluss der thierischen Körpers (*Zeitschr. für Hygiene*, IV, 1888, p. 353).

(2) Büchner, Ueber bacterientödtende Wirkung der zellenfreien Blutserum (*Centralbl. für Bakt.*, V, 1889, p. 817, et VI, p. 1).

(3) Büchner, *Münch. med. Wochenschr.*, 1891, p. 437 ; 1894 ; 1897, p. 300.

(4) Pfeiffer, Weitere Untersuchungen über das Wesen der Choleraimmunität und über specifischbaktericide Processe (*Zeitschr. für Hygiene*, XVIII, 1894, p. 1). — Zur Differenzialdiagnose der Vibrionen der Cholera asiatica mit Hülfe der Immunisierung (*Ibid.*, XIX, 1895, p. 759).

leuses, finalement même se fondre pour ainsi dire dans le liquide ambiant. Metschnikoff (1) et Bordet (2) ont montré qu'on pouvait obtenir cette même modification en faisant agir *in vitro* du sérum de cobaye immunisé ou tout autre sérum anticholérique sur une émulsion de Vibrions. Comme on peut suivre de plus près le phénomène, on observe en plus, au début, une agglutination manifeste des éléments microbiens précédant tout changement de forme. Il sera parlé plus loin de cette action particulière.

Ici, l'action bactéricide est particulièrement marquée en raison des conditions spéciales de l'humeur employée qui provient d'un animal immunisé contre le choléra, d'abord, puis ensuite de la grande sensibilité du microbe employé, les Vibrions cholériques étant bien moins résistants aux actions destructives que beaucoup d'autres espèces.

La résistance des différentes Bactéries au pouvoir destructeur du sang peut être très variable. Dans les expériences de Büchner, le *Bacille du pus bleu* s'est montré le plus résistant ; le *Bacille typhique*, le *Spirille du choléra*, le *Bacillus coli communis* ont été particulièrement sensibles ; le *Bacille du charbon*, le *Bacille du rouget du porc* sont influencés d'une façon intermédiaire.

Le sang de divers animaux montre des différences très grandes. Tandis que le sérum du sang d'homme, de chien, de lapin, de poule, de pigeon, est très actif, celui du cheval et du bœuf ne possède aucune action bactéricide. Il y a même plus : l'action bactéricide du sang peut varier dans la même espèce d'un individu à l'autre ; ce qui peut expliquer certaines prédispositions. Il ne paraît du reste pas exister de rapport immédiat entre l'action bactéricide du sang d'un animal donné et la facilité avec laquelle il est infesté par une Bactérie pathogène ou lui résiste. Le sang d'animaux réfractaires à un microbe peut être un bon milieu de culture pour ce microbe ; et, inversement, le sang d'animaux non réfractaires à un microbe peut être doué de propriétés bactéricides très énergiques pour ce même microbe. Ces rapports peuvent toutefois être modifiés par certains procédés, en particulier par la vaccination ; c'est une des raisons les plus plausibles de l'immunité acquise après vaccination. En somme, cette propriété bactéricide du sang paraît surtout dépendre d'un état spécial des leucocytes, pouvant ne se manifester que sous des influences déterminées, peut-être sous l'influence d'excitations causées par la présence de produits solubles d'origine microbienne.

Quant à la puissance bactéricide du sang d'une espèce animale pour une Bactérie donnée, il faudra de nombreuses expériences pour la déterminer avec une approximation suffisante. D'après Büchner, un millimètre cube de sang de lapin peut détruire environ un millier de *Bacilles typhiques*. Nissen (3) a étudié l'action nocive du sang sur un grand nombre d'espèces de Bactéries ; il a constaté que cette action varie

(1) Metschnikoff, Études sur l'immunité. Sur la destruction extracellulaire des Bactéries (*Ann. de l'Inst. Pasteur*, IX, 1895, p. 433).

(2) Bordet, Les leucocytes et les propriétés actives du sérum chez les vaccinés (*Ann. de l'Inst. Pasteur*, IX, 1895, p. 462). — Les sérums hémolytiques, leurs antitoxines et les théories des sérums cytologiques (*Ibid.*, XIV, 1900, p. 257).

(3) Nissen, Zur Kenntniss der Bacterien vernichtenden Eigenschaft des Blutes (*Zeitschr. für Hygiene*, VI, 1889, p. 487).

considérablement suivant l'espèce. En injectant de fortes quantités d'une espèce inoffensive, le *Micrococcus aqualilis* par exemple, le sang perd une grande partie de son pouvoir bactéricide : du produit de culture filtré sur un filtre Chamberland n'affaiblit jamais l'action du sang. L'affaiblissement ne provient donc pas d'un apport de produits solubles, mais nécessite la présence des microbes vivants.

D'après Pekelharing (1), le sang et la lymphe du lapin pourraient même détruire les spores si résistantes du *Bacille du charbon*.

Des humeurs autres que le sang et la lymphe possèdent des propriétés bactéricides bien marquées ; ceci se conçoit facilement d'après l'origine cellulaire des produits bactéricides. L'urine, d'après Lehmann (2), aurait une action évidente sur les cultures de charbon et de choléra, moindre sur celles de *Bacille typhique*. Cette action paraît due à la présence des phosphates acides dans l'urine ; des solutions de phosphate acide de potasse agissent dans le même sens. Würtz (3) a reconnu au blanc d'œuf cette même propriété bactéricide ; Fokker (4) l'a signalée pour le lait. Adami (5) reconnaît au foie une *fonction bactéricide* très marquée. Les mucus nasal, buccal, vaginal, utérin agissent dans le même sens. Tous les mucus, du reste, de l'homme ou des animaux paraissent jouir de propriétés bactéricides énergiques (6).

London (7) a signalé la diminution des propriétés bactéricides du sang de pigeon et de lapin à l'égard du *Bacille du charbon*, lorsque les animaux étaient soumis à des influences défavorables, telles que le jeûne, la gêne respiratoire, l'excitation des nerfs sensibles, l'état urémique.

Alexine et sensibilisatrices.

Partout se rencontre la même substance, l'*alexine*, qui paraît bien être un facteur normal du sang et des humeurs. Les procédés d'immunisation ou de vaccination n'augmentent pas cette alexine, que l'organisme produirait d'une façon régulière, sous certaines influences. Elle ne paraît avoir aucune spécificité, se trouve à doses égales dans le sérum des animaux neufs et dans celui des vaccinés. Seule, elle ne peut pas exercer d'action bactéricide ; il lui faut une action adjuvante, d'où le nom de *complément* que lui donne Ehrlich ; alexine et complément sont synonymes. Il lui faut la présence d'une substance spéciale qui agit sur les éléments à atteindre, microbes ou éléments cellulaires, pour les préparer à subir l'action spéciale, action de désagrégation, de dissolution, de destruction, action lytique, suivant le cas *bactériolyse*, *hémolyse*, *cytolyse*. La manière d'agir de cette dernière substance est encore

(1) Pekelharing, La propriété bactéricide du sang (*Sem. méd.*, 1892, n° 63).

(2) Lehmann, Ueber die pilztödtende Wirkung des frischen Harns des gesunden Menschen (*Centralbl. für Bakt.*, VII, 1890, p. 457).

(3) R. Würtz, De l'action bactéricide du blanc d'œuf (*Sem. méd.*, 1890, n° 3).

(4) Fokker, Onderzoekigen nover melkyzuugisting (*Weekblad van hed nederl. Tijdschrift van Geneeskunde*, 1, 11, 1890).

(5) Adami, On the bactericidal functions of the liver and the etiology of progressive hepatic cirrhosis (*Montreal med. Journal*, janvier 1899).

(6) Würtz et Lermoyez, Le pouvoir bactéricide du mucus nasal (*Soc. de Biol.*, 1894). — F. Arloing, Recherches sur le pouvoir bactéricide de la mucine (*Journal de physiol. et de pathol. gén.*, IV, 1902).

(7) London, Influence de certains agents pathologiques sur les propriétés bactéricides du sang (*Arch. des sc. biol. de Saint-Pétersbourg*, V, 1897, p. 88).

peu expliquée. Pour Bordet (1), elle serait comparable à l'action des mordants dans la teinture, rendant *sensible* le microbe à l'action de l'alexine, qui se fixe alors sur lui et peut exercer son effet ; d'où le nom de *sensibilisatrice* qu'il lui applique. Pour Ehrlich (2), l'action serait plus complexe : cette substance servirait d'intermédiaire entre le microbe et l'alexine, fixant l'alexine sur le microbe, lui permettant d'agir sur lui, alors que, sans elle, l'alexine resterait libre dans le milieu, sans effet sur le microbe ; elle serait ainsi une sorte de trait d'union entre les deux ; d'où le nom qu'il propose d'*ambocepteur*, ou secondairement, comme synonymes, *corps intermédiaire*, *immünkorper*.

La sensibilisatrice, elle, est spécifique, produite seulement dans l'organisme sous l'influence de l'excitation spéciale déterminée par le microbe, l'élément ou la substance introduits et en proportion qui peut être en certains rapports avec la quantité employée. Il peut donc y avoir un grand nombre de sensibilisatrices, autant que de substances à l'égard desquelles l'organisme peut réagir dans un sens de défense.

Comme ces sensibilisatrices sont formées uniquement dans un but de résistance aux corps étrangers introduits dans l'organisme, on leur donne le nom général d'*anticorps*, en dénommant *antigènes* les substances qui provoquent leur formation. A un antigène donné correspond toujours un anticorps particulier. Ce sont des termes qui reviendront souvent, en particulier, dans l'étude sur l'immunité.

On est peu fixé encore sur la nature de ces substances. On est très porté à les rapprocher des diastases. Elles seraient peut-être plutôt des colloïdes.

L'alexine a comme principale propriété d'être détruite par un chauffage d'une demi-heure à 56° ; elle est *thermolabile*. Elle n'est pas spécifique, mais commune à tous les sérums, à tous les liquides organiques. Elle ne s'y trouve qu'en quantité limitée et peut être entièrement fixée par un mélange *antigène-anticorps* de nature quelconque, en proportions déterminées.

Il semble bien n'y avoir qu'une seule alexine, indifférente par son action, qui est seulement déterminée par la sensibilisatrice. Certains expérimentateurs en admettent plusieurs : Metschnikoff au moins deux, une hémolytique, l'autre bactéricide ; Ehrlich et Morgenroth un grand nombre.

Les sensibilisatrices sont encore moins connues. Elles sont rigoureusement spécifiques ; ce sont des anticorps qui se développent uniquement dans l'organisme sous l'influence des antigènes correspondants. Elles sont relativement résistantes à la chaleur, *thermostabiles*, ne se détruisent qu'à partir de 70°. Cette différence de résistance à la chaleur permet de les séparer de l'alexine en chauffant une demi-heure à 56° et d'étudier leurs propriétés séparément. La sensibilisatrice augmente avec l'introduction d'antigène, injection immunisante par exemple, mais seulement jusqu'à un maximum qu'on ne peut guère dépasser.

Les sérums d'animaux neufs renfermeraient des *sensibilisatrices*

(1) Bordet, Les sérums hémolytiques, leurs antitoxines et les théories des sérums cytolytiques (*Ann. de l'Inst. Pasteur*, XIV, 1900, p. 257). — Bordet et Gengou, Sur l'existence de substances sensibilisatrices dans la plupart des sérums antimicrobiens (*Ibid.*, XV, 1901, p. 289).

(2) Ehrlich et Morgenroth, Ueber Haemolysine (*Berl. klin. Wochenschr.*, 1901, nos 21 et 22).

normales en petite quantité; les *sensibilisatrices spécifiques*, à effets beaucoup plus énergiques, ne se rencontreraient que dans les sérums des animaux immunisés.

Quelle est l'origine de ces substances, alexine et sensibilisatrices ?

L'alexine est sans contredit produite par les leucocytes. C'est ce que démontrent les recherches de Denys et Havet (1), de Löwit, de Schattenfroh, de Besredka, de Daubler, de Gengou (2) tout particulièrement. Elle est sécrétée par les leucocytes qui se trouvent dans le sang et les humeurs. Pour Metschnikoff, normalement elle ne sortirait pas des leucocytes et n'agirait qu'à leur intérieur sur les corps absorbés par phagocytose : il n'existerait donc pas d'alexine libre dans le sang ou les humeurs. Elle n'y pourrait être mise en liberté qu'à la suite de l'altération des leucocytes, partielle ou complète, mort ou destruction. Il paraît cependant probable qu'il existe dans le sang, à l'état libre, de l'alexine qui pourrait être regardée comme une véritable sécrétion des leucocytes normaux (3).

Les sensibilisatrices existent bien réellement en liberté dans le sang et les humeurs sécrétées par les leucocytes sous les influences déterminantes des antigènes. Sur ce point, l'accord est complet.

Au voisinage de ces substances bactéricides proprement dites, on a signalé, dans les mêmes humeurs, la présence de produits autres, agissant toutefois dans le même sens, contre les microbes, en modifiant leur état dans un sens défavorable ou en neutralisant les substances toxiques qu'ils produisent, ou bien sur les cellules de défense de l'organisme en leur donnant une activité plus grande, produits concourant par conséquent à la résistance de l'organisme. Dans la première catégorie, on peut citer les agglutinines, les précipitines et les antitoxines; dans la seconde, les opsonines.

Agglutinines.

Les *agglutinines* sont des substances qui déterminent l'*agglutination* des microbes en suspension dans des liquides, leur réunion en amas plus ou moins considérables, où ils se trouvent accolés les uns aux autres, englués dans une gangue fondamentale qui les retient, en même temps que disparaît toute motilité s'il en existe.

Bordet (4) avait observé qu'en étudiant *in vitro* le phénomène de Pfeiffer, en faisant agir du choléra-sérum sur des Vibrions cholériques, la dégénérescence granuleuse et la dissolution des Vibrions étaient précédées d'une réunion des microbes en amas et de leur immobilisation.

(1) Denys et Havet, Sur la part des leucocytes dans le pouvoir bactéricide du sang de chien (*La Cellule*, X, 1893).

(2) Gengou, Origine de l'alexine des sérums normaux (*Ann. de l'Inst. Pasteur*, XV, 1901, p. 68 et 232).

(3) Rehns, Démonstration de l'existence des hémolysines composées, spécialement des alexines, à l'état libre et actif dans le sang circulant (*Soc. de Biol.*, 23 mars 1901). — Falloise, Sur l'existence de l'alexine hémolytique dans le plasma sanguin (*Bull. de l'Acad. royale de Belgique*, cl. des sciences, 1903, n° 6, p. 521).

(4) Bordet, Les leucocytes et les propriétés actives du sérum chez les vaccinés (*Ann. de l'Inst. Pasteur*, IX, 1895).

Grüber et Durham (1), observant la même réunion en amas de divers microbes, *Bacille typhique* et *Vibrion cholérique* principalement, sous l'influence respective du sérum d'animaux vaccinés à leur aide, décrivirent le phénomène de l'agglutination et annoncèrent que la réaction pouvait servir à caractériser l'espèce microbienne qui la présente, qu'on avait, par exemple, sûrement affaire au *Bacille typhique* si le microbe examiné se montrait agglutiné par le sérum des animaux vaccinés contre ce Bacille.

En partant de ces données, Widal (2) a montré que le sérum des individus atteints de fièvre typhoïde pouvait déterminer le même phénomène de l'agglutination, au contact d'une culture convenable de Bacille typhique; il apportait ainsi un élément précieux pour le diagnostic.

Les mêmes faits ont été constatés depuis pour beaucoup d'autres espèces microbiennes, permettant ainsi d'établir que le phénomène avait une véritable portée générale, qu'on avait en mains une réelle méthode générale s'appliquant d'un côté à la caractérisation des espèces microbiennes, de l'autre au diagnostic des affections microbiennes.

L'agglutination apparaît nettement comme un moyen de défense de l'organisme contre l'invasion microbienne. Elle immobilise et réunit les microbes, qu'elle empêche de se répandre et d'envahir; comme cela se voit dans le phénomène de Pfeiffer, elle précède et prépare la désagrégation complète. Duclaux (3) fait de l'agglutination un simple phénomène de coagulation. Si l'on considère alors le phénomène complet, aboutissant à la dissolution, à la bactériolyse, on doit reconnaître qu'il a des rapports réels avec la digestion des albuminoïdes où la dissolution est aussi toujours précédée d'une coagulation. On doit cependant penser que les deux réactions successives sont bien dues à deux substances différentes, l'agglutination aux agglutinines, la dissolution à l'action combinée de l'alexine et des sensibilisatrices. Toutefois l'agglutination est une propriété biologique générale qui n'est pas seulement dirigée contre les microbes; Bordet (4) a montré qu'à la suite d'injections de sérum défibriné à des animaux, le sang de ces derniers acquérait un pouvoir agglutinant très marqué à l'égard des globules rouges de l'espèce animale ayant fourni le premier sérum; d'autres substances donneraient aussi des résultats de même ordre.

Comme les substances qui viennent d'être citées, les agglutinines paraissent être voisines des diastases ou peut-être des colloïdes. Elles sont thermostabiles, supportent un chauffage à 55°; elles ne sont détruites que vers 70°. Elles résistent à la dessiccation, à la putréfaction; elles sont solubles dans l'eau et précipitables par l'alcool. Elles peuvent être arrêtées par les filtres, mais passeraient à travers les membranes vivantes, se retrouvant dans le lait, les urines, des sécrétions diverses. Toutefois, pour cette présence intéressante, il se peut qu'elle soit plutôt le fait du passage des globules blancs.

(1) Grüber et Durham, Theorie der aktiven und passiven Immunität gegen Cholera, Typhus und verwandte Krankheitsprogresse (*Münch. med. Wochenschr.*, 1896, n° 9).

(2) Widal, Sur les propriétés agglutinantes et bactéricides du sérum des convalescents de fièvre typhoïde (*Sem. méd.*, 1896, n° 51). — Séro-diagnostic de la fièvre typhoïde (*Soc. méd. des hôp.*, 26 juin 1896).

(3) Duclaux, Traité de microbiologie, t. II, p. 706.

(4) Bordet, Sur la dissolution et l'agglutination des globules rouges par le sérum d'animaux injectés de sang défibriné (*Ann. de l'Inst. Pasteur*, XII, 1898, p. 688).

Pour expliquer le phénomène de l'agglutination, Grüber admettait que la couche superficielle des éléments microbiens se gonflait, devenait visqueuse et adhérait aux microbes voisins. Pour Nicolle (1), le corps des microbes, probablement la membrane et ses couches externes diffluentes, renferme une substance particulière, de nature albuminoïde, la *substance agglutinable* qui, sous certaines influences, se coagule, réunissant ainsi, en les accolant, un nombre plus ou moins considérable de microbes. Ce phénomène de coagulation de la substance agglutinable se produit surtout sous l'influence des agglutinines qui sont formées dans les sérums ou les humeurs des animaux soumis aux injections des microbes spéciaux ou de leurs produits, ou des individus en état d'infection. Mais l'agglutination des microbes peut aussi être provoquée par d'autres moyens; Malvoz (2) a montré que l'aldéhyde formique, le sublimé, l'eau oxygénée, le sulfate d'ammoniaque, les acides acétique et lactique dilués, la safranine, la vésuvine et la fuchsine en solutions aqueuses bien filtrées, provoquaient, avec certains microbes au moins, une agglutination souvent aussi belle que celle produite avec le sérum spécifique. Blachstein (3) a observé le même fait, pour le *Vibrion cholérique*, avec la chrysoïdine. Toutefois, d'après Bossaert (4), le phénomène n'aurait ni la sensibilité ni la netteté qui s'observent avec le sérum spécifique.

La propriété agglutinable qu'ont les microbes n'est cependant pas une propriété réellement vitale, puisque, comme Bordet (5) l'a montré le premier, les microbes morts réagissent de cette façon aussi bien que les microbes vivants. Les cultures de *Bacille typhique* en particulier, tuées par la chaleur, l'addition de quelques gouttes de formol (6), le thymol, le chloroforme, l'acide phénique, le sublimé (7), sont très nettement agglutinées par le sérum de sujets en infection typhique.

Ce n'est pas non plus une propriété fixe, immuable, mais, au contraire, contingente, pouvant faire totalement défaut. Il est difficile, dès lors, d'en faire, comme on l'a voulu, un caractère réellement spécifique. Les recherches de Joos (8), d'un autre côté, montrent la nécessité absolue de la présence de chlorure de sodium, pour observer la production du phénomène de l'agglutination, comme troisième facteur essentiel pouvant

(1) Malvoz, Sur la présence d'agglutinines spécifiques dans les cultures microbiennes (*Ann. de l'Inst. Pasteur*, XIII, 1898, p. 630).

(2) Malvoz, Recherches sur l'agglutination du *Bacillus typhosus* par les substances chimiques (*Ann. de l'Inst. Pasteur*, XI, 1897, p. 582).

(3) Engels, Ueber die Verwendbarkeit des Chrysoidins bei der Choleradiagnose (*Centralbl. für Bakt.*, XXI, 1897, p. 84).

(4) Bossaert, Étude sur l'agglutination comparée du Vibrion cholérique et des microbes voisins par le sérum spécifique et les substances chimiques (*Ann. de l'Inst. Pasteur*, XII, 1898, p. 857).

(5) Bordet, Sur le mode d'action des sérums préventifs (*Ann. de l'Inst. Pasteur*, X, 1896, p. 193).

(6) Widal et Sicard, La réaction agglutinante sur les Bacilles morts (*Soc. de Biol.*, 30 janvier 1897).

(7) Van de Velde, Influence de la chaleur, des sels, des métaux lourds et d'autres antiseptiques sur les cultures de Bacille typhique employées dans le séro-diagnostic de la fièvre typhoïde (*Acad. de méd. de Belgique*, 27 mars 1897, et *Sem. méd.*, 1897, n° 15, p. 114).

(8) Joos, Ueber die Bedeutung anorganischer Salze für die Agglutination der Bakterien (*Centralbl. für Bakt.*, 1re Abth., XXX, 1901, p. 853). — Untersuchungen über den Mechanismus der Agglutination (*Zeitschr. für Hygiene*, XXXVI, 1901, p. 422, et XL.

réduire la réaction à une simple combinaison chimique entre la substance agglutinable des microbes, la substance agglutinante du sérum et le chlorure de sodium, obéissant en tout aux lois chimiques présidant à ces combinaisons.

La substance agglutinable diffuse du corps des microbes dans le milieu. Dans les cultures jeunes, elle est surtout dans les microbes; le bouillon s'en charge avec l'âge; il reste cependant toujours, dans les corps microbiens, des microbes bien lavés, mis en émulsion dans de l'eau distillée, pouvant encore être agglutinés. Les cils, lorsqu'il en existe, paraissent riches, en substance agglutinable, probablement parce qu'ils représentent une surface très grande de couche externe.

L'origine des agglutinines est plus controversée. Pour Bordet, elles viendraient des leucocytes. Cette opinion n'est pas démontrée. Elles prennent cependant naissance dans le sang ; Kraus et Schiffmann (1) croient que c'est aux dépens de l'endothélium vasculaire. Leur passage au travers des parois des vaisseaux n'aurait lieu qu'après altération de ces parois; aussi l'urine ne devient agglutinante que lorsqu'elle renferme de l'albumine.

La production d'agglutinine se fait surtout sous l'influence de l'infection. Le fait que les sérums spécifiques donnent au mieux la réaction d'agglutination l'avait fait considérer au début comme une véritable *réaction d'immunité* (2) ; les recherches de Widal ont prouvé qu'il n'en était rien, car le phénomène existe pendant la période d'infection, et même plus marqué que dans la période d'immunité complète. C'est une véritable *réaction d'infection*, qui peut déjà s'observer très tôt dans l'infection, permettant ainsi un diagnostic souvent précoce. Aussi, la *séro-réaction* et la méthode qui l'applique, le *séro-diagnostic,* rendent d'excellents services. A un point de vue général, le séro-diagnostic des microbes est des plus précieux pour la détermination exacte de bien des espèces. A un point de vue plus spécial, en matière clinique, le séro-diagnostic des infections rend de très grands services pour le diagnostic de beaucoup d'infections et tout particulièrement la fièvre typhoïde, permettant le diagnostic précoce des formes normales, celui des formes légères et anormales, si souvent méconnues, et la distinction nette de tous les états typhoïdes relevant d'autres causes que l'infection éberthienne.

Les agglutinines ne se forment pas seulement sous l'influence de l'infection ou, d'une manière plus générale, de la pénétration dans l'organisme d'éléments vivants étrangers, des globules rouges d'autre espèce par exemple; d'autres causes peuvent en déterminer la formation. Il existe dans le sang des agglutinines normales, pouvant être actives sur tel ou tel microbe. C'est le cas pour le *Colibacille* (3); le sérum de

1902, p. 203). — Étude expérimentale sur le phénomène de l'agglutination (*Journ. méd. de Bruxelles*, 9 mai 1901). — L'agglutination des microbes (*Ibid.*, 7 août 1902).

(1) Kraus et Schiffmann, Sur l'origine des anticorps, précipitines et agglutinines (*Ann. de l'Inst. Pasteur*, 1906, XX, p. 225).

(2) Pfeiffer et Kolle, Ueber die specifische Immunitätsreaktion der Typhusbacillen (*Zeitschr. für Hygiene*. XXI, 1896, p. 203). — Weitere Untersuchungen über die specifische Immunitätsreaktion der Choleravibrionen im Thierkörper und Reagensglase (*Centralbl. für Bakt.*, XIX, 1896, p. 129).

(3) Geisse, Ueber Coliagglutinine (*Centralbl. für Bakt.*, 1re Abth., Originale, XLVI, 1908, p. 359).

beaucoup d'individus normaux est agglutinant pour ce microbe, parfois jusqu'à 1 p. 300 ; il en est de même pour le sérum d'espèces animales diverses. En outre, des agglutinines peuvent être produites sous l'influence de substances qui n'ont aucun rapport avec les microbes qui subissent l'agglutination : Collins (1) a vu le pouvoir agglutinant à l'égard du *Bacille de la dysenterie* (type Flexner) augmenter dans de fortes proportions, chez le lapin inoculé, après injection de pancréatine, d'invertine, de nucléine, d'indol, de scatol, même de phosphates alcalins ou terreux.

Enfin, dans un même sérum spécifique, à côté de l'agglutinine principale il peut se former des agglutinines secondaires, qui peuvent alors agir soit sur des espèces ou races microbiennes voisines, elles sont dites *coagglutinines* ou *agglutinines de groupe*, soit sur des espèces bien différentes, *hétéroagglutinines*.

On ne peut donc pas dire que la réaction d'agglutination produite à l'aide d'un sérum spécifique est une réaction réellement et absolument spécifique. Elle n'a qu'une spécificité relative ou partielle. A côté de la partie réellement spécifique de l'agglutination produite par l'agglutinine spécifique, il y a sa partie en quelque sorte indifférente, que peuvent déterminer les quantités d'agglutinines diverses, non spécifiques, qui se trouvent à côté de la première.

Des exemples démontrant le bien fondé de ces conceptions seront donnés lors de l'étude de diverses espèces microbiennes. Comme l'ont montré Widal et Sicard (2), le sérum typhique humain agglutine souvent les espèces paratyphiques à un taux assez élevé. Wilson (3) dit que le sérum des individus atteints de méningite cérébro-spinale peut agglutiner de 1 : 50 à 1 : 100 le *Bacille typhique* et le *Colibacille* ; le *Méningocoque* et le *Gonocoque* sont tous deux agglutinés par leurs sérums spécifiques (4).

Il y a, par contre, des exemples où l'agglutination paraît très précise et pourrait passer pour absolument spécifique. C'est souvent le cas pour les diverses races du *Bacille de la dysenterie* par exemple. Le sérum d'un animal ou d'un malade infecté par le Bacille du type Shiga agglutine ce microbe et reste sans action sur le Bacille du type Flexner, d'après Martini et Lentz (5). Toutefois, le fait annoncé n'est pas constant, il y a des exceptions ; certains sérums sont agglutinants pour les deux types ; Dopter (6) a même vu le sérum d'un malade porteur du Bacille type Shiga ne pas agglutiner ce microbe et agglutiner celui du type Flexner.

On peut tirer de là diverses conclusions au sujet de l'agglutination : qu'un sérum donné peut la provoquer dans des cultures microbiennes autres que celles du microbe qui a servi à l'obtenir ; que des sérums

(1) Collins, The production of agglutinins in the animal body by the inoculation of substances other than products of bacterial origins (*Journ. of exper. med.*, X, 1908, p. 529).

(2) Widal et Sicard, Étude sur le séro-diagnostic et sur la réaction agglutinante chez les typhiques (*Ann. de l'Inst. Pasteur*, XI, 1897, p. 353).

(3) Wilson, On heterologous agglutinins (*Congrès de British medical Association* à Belfast, juillet 1909).

(4) Dopter et Koch, La coagglutination du Méningocoque et du Gonocoque (*Soc. de Biol.*, 1908, n° 27).

(5) Martini et Lentz, Ueber die Differenzierung der Ruhrbacillen mittelst Agglutination (*Zeitschr. für Hygiene*, 1902, XLI, p. 591).

(6) Dopter, Les dysenteries. Paris, Doin, 1909.

d'animaux normaux la produisent sur des microbes déterminés; que des produits chimiques injectés dans le sang peuvent donner à ce liquide la propriété de la produire; que certains produits chimiques ont le pouvoir de la provoquer directement chez plusieurs microbes.

On voit donc que, pour se servir de l'agglutination comme caractère de diagnose, il est tout à fait nécessaire de l'employer dans des conditions déterminées, qui permettront d'apprécier l'énergie de la réaction provoquée, puis de faire un examen et une critique serrée des résultats obtenus, de façon à écarter aussi sûrement que possible les diverses causes d'erreur ou de variation. Tous les points importants de la question seront étudiés plus loin lors de l'étude technique des méthodes d'observation, puis surtout aux différents cas particuliers les plus intéressants dans la description des espèces.

Précipitines.

Kraus (1) a montré que lorsqu'on ajoute du sérum antityphique à une culture de *Bacille typhique* bien privée de microbes par filtration, il se forme un trouble fin; le liquide, par le repos, s'éclaircit et montre un léger dépôt formé de flocons fibrineux. Le même phénomène s'observe dans des cultures de *Bacille de la peste* et de *Vibrion cholérique*, avec les sérums correspondants. C'est là une véritable *précipitation*. Il existe donc, dans les sérums immunisants, des substances qui occasionnent cette précipitation; Kraus les a nommées *précipitines*.

Elles sont, comme les agglutinines, formées dans l'organisme sous l'influence des microbes ou des produits microbiens; comme elles aussi, elles sont dirigées contre les éléments microbiens qu'elles contribuent à immobiliser.

Le phénomène biologique de la précipitation n'est pas spécial aux microbes, mais semble avoir une portée générale, comme celui de l'agglutination. Ainsi le sérum d'un animal soumis à des injections de sang d'un animal d'une autre espèce devient précipitant pour le sérum de ce dernier; Uhlenhuth (2) en a fait de très intéressantes applications médico-légales, montrant qu'il était possible par ce moyen de reconnaître la nature des taches de sang, en particulier de sang humain. Également en préparant des animaux avec une substance albuminoïde donnée, on obtient un sérum qui précipite électivement cette substance; on a là un moyen très sensible de reconnaître la présence, dans l'urine par exemple, de telle ou telle matière albuminoïde.

Toutefois, le phénomène n'a pas une spécificité absolue. Il semble y avoir des précipitines agissant à la fois sur plusieurs espèces microbiennes; telle celle du sérum antiméningococcique qui agit sur le *Méningocoque*, mais aussi bien sur le *Gonocoque*, le *Pneumocoque* et d'autres espèces voisines; telles aussi celles des sérums antidysentériques qui précipitent les diverses races du *Bacille dysentérique*. Dopter croit

(1) Kraus, Ueber specifische Reaktionen in Keimfreien Filtraten aus Cholera-Typhus-Pestbazillenkulturen erzeugt durch homologes Serum (*Wiener klin. Wochenschr.*, 1897, n° 32).

(2) Uhlenhuth, Das biologische Verfahren zur Erkennung und Unterscherdung von Menschen-und Tierblut, sowie anderer Eiweissubstanzen und seine Anwendung in der forensischen Praxis. Iena, G. Fischer, 1905.

ici à l'existence dans un même sérum de plusieurs précipitines différentes, de *coprécipitines*; l'une d'entre elles, seule, serait réellement spécifique. Il faut, tout de même, n'attribuer à de telles réactions qu'une valeur relative dans la détermination.

Au point de vue de leur nature, les précipitines sont voisines des agglutinines ; elles résistent quelque temps à 55°, mais sont détruites vers 65°. Elles coexistent avec les agglutinines; un sérum qui a précipité ne perd pas son pouvoir agglutinant ; il y a toutefois entre les deux phénomènes : précipitation et agglutination, des connexions très intimes, le premier ne constituant en quelque sorte que la phase de début du second.

D'après von Dungern (1), les éléments figurés du sang participent à la genèse des précipitines; Kraus et Levaditi (2) en ont reconnu la présence à l'intérieur des leucocytes ; Kraus et Schiffmann (3) concluent qu'elles se forment bien dans le système vasculaire, pas du tout dans les organes, sans pouvoir préciser si ce sont les globules blancs, les globules rouges ou les éléments endothéliaux qui agissent comme producteurs.

La marche à suivre pour la constatation de ces faits intéressants sera exposée plus loin, à la *Technique bactériologique* et lors de l'étude des espèces pour lesquelles ils doivent intervenir.

Antitoxines.

La lutte contre les toxines se fait par des processus analogues à ceux employés contre les microbes, par des réactions cellulaires et des modifications humorales. Les premières dépendent de la phagocytose proprement dite : les phagocytes fixent et détruisent les toxines. Dans cette *fonction antitoxique*, les leucocytes ont un rôle important ; à côté d'eux viennent les cellules hépatiques, les éléments de la rate et de la moelle osseuse, ceux du corps thyroïde et des capsules surrénales, comme le montrent les expériences de Charrin et Langlois (4).

Les modifications humorales consistent dans la formation, sous l'influence des antigènes constitués par les toxines, d'anticorps spéciaux, les *antitoxines*.

La découverte, par Behring et Kitasako (5), du *pouvoir antitoxique* du sérum des animaux soumis à l'action des toxines du *Bacille du tétanos* et du *Bacille de la diphtérie*, a conduit ces expérimentateurs à admettre la présence dans le sang d'une substance particulière agissant contre la toxine, en annihilant les effets, une véritable antitoxine.

C'est bien un produit spécial, réellement spécifique, puisqu'il ne se forme que sous l'action de toxines véritablement spécifiques. On n'en trouve généralement pas dans le sang des animaux naturellement réfractaires à l'infection considérée.

Cette propriété antitoxique est tout à fait distincte du pouvoir bac-

(1) Von Dungern. Die Antikörper. Iena, G. Fischer, 1903.

(2) Kraus et Levaditi, Sur l'origine des précipitines (*C. R. de l'Acad. des sc.*, 1904).

(3) Kraus et Schiffmann, Sur l'origine des anticorps, précipitines et agglutinines (*Ann. de l'Inst. Pasteur*, 1906, XX, p. 225).

(4) Charrin, Les fonctions antitoxiques (*Sem. méd.*, 1895, n° 18).

(5) Behring, *Deutsche med. Wochenschr.*, 1890, n° 50. — Kitasato, *Zeitschr. für Hygiene*, X, 1891, p. 267.

téricide ; un chauffage à 55°, qui détruit le dernier, n'a aucune action sur la première.

La première idée qui est venue à l'esprit des expérimentateurs était que cette antitoxine était une simple modification, une transformation directe de la toxine. Bien des faits vont contre cette théorie ; la transmission héréditaire du pouvoir antitoxique et de l'immunité, nettement établie comme nous le verrons plus loin, les rapports de ce pouvoir antitoxique avec les variations d'éléments déterminés, la production nouvelle d'antitoxine observée chez des animaux auxquels on enlève, par des saignées répétées, une quantité de sang égale au volume total du liquide, sans diminuer très sensiblement son pouvoir antitoxique, tout cela dénote nettement que la substance antitoxique provient de l'organisme lui-même, qui la produit sous des influences de la toxine spécifique.

Le sérum gagne donc un pouvoir antitoxique. Dans les infections ordinaires, ce pouvoir antitoxique est assez faible, l'organisme ne produisant qu'une quantité restreinte d'antitoxine. Il peut devenir très grand chez les animaux soumis à l'action de très fortes quantités de toxines, comme ceux que l'on immunise pour obtenir un sérum thérapeutique.

L'antitoxine ne se trouve pas seulement dans le sang, mais dans d'autres liquides ou humeurs, normales ou pathologiques, de l'organisme. On en a signalé la présence dans le lait (1), l'urine, les sérosités pathologiques du péricarde, de la plèvre, du péritoine, etc. L'antitoxine de ces humeurs provient naturellement du sang.

La nature des antitoxines est peu connue. Guérin et Macé (2) considèrent l'antitoxine diphtérique du sérum des chevaux immunisés à l'égard de la diphtérie comme une substance appartenant au groupe des diastases ; elle en présente en effet la plupart des propriétés.

L'organisme peut produire des antitoxines sous l'influence de toxines autres que les toxines microbiennes : ainsi pour l'abrine du jéquirity, la ricine du ricin (3), les toxines de Champignons vénéneux, les toxines du venin de serpent (4), du sang de l'anguille (5). La formation d'antitoxines, comme, d'une façon générale, la formation d'anticorps, paraît donc être bien un procédé général de défense contre toute une catégorie de toxiques et non pas, comme on l'a cru longtemps, une fonction dirigée spécialement contre les éléments microbiens.

Le mode d'action de l'antitoxine sur la toxine, la neutralisation partielle ou totale des effets de la toxine, est encore bien peu connu.

On avait pensé au début à une véritable destruction de la toxine par

(1) Ehrlich, Ueber Immunität durch Vererbung und Saügung (*Zeitschr. für Hygiene*, XII, 1892). — Brieger et Ehrlich, Beiträge zur Kenntniss der Milch immunisierter Thiere (*Ibid.*, XIII, 1893).

(2) Guérin et Macé, Sur l'antitoxine diphtérique (*C. R. de l'Acad. des sc.*, 5 août 1895).

(3) Ehrlich, Zur Kenntniss der Antitoxinwirkung (*Fortschr. der Med.*, 1897, n° 2, p. 41). — Calmette et Déléarde, Sur les toxines non microbiennes (*Ann. de l'Inst. Pasteur*, X, 1896, p. 675).

(4) Calmette, Sur le venin des serpents (*Ann. de l'Inst. Pasteur*, VIII, 1894, p. 275 ; IX, 1895, p. 225 ; XI, 1897, p. 214).

(5) Héricourt et Richet, Sérothérapie *in vitro* dans l'intoxication par le sang d'anguille (*Soc. de Biol.*, 10 avril 1897).

l'antitoxine, comme ferait un acide mélangé à une base. Mais bien des expériences démontrent que la toxine n'est ni neutralisée, ni détruite ; Wassermann, avec le sérum antipyocyanique, montre que le chauffage à 80° détruit l'antitoxine et n'agit pas sur la toxine, dont les effets peuvent alors être manifestes ; Roux et Calmette ont observé les mêmes effets avec le sérum antivenimeux et le venin de serpent, qui se rapproche beaucoup des toxines microbiennes. Dans le mélange, la toxine et l'antitoxine gardent leur individualité. Le fait de voir annihiler les effets de la toxine serait comparable à ce qu'on appelle *action de présence* dans certaines réactions chimiques. Ou bien l'antitoxine agirait en excitant l'action leucocytaire, agirait sur les leucocytes comme les sensibilisatrices agissent sur les microbes pour l'alexine, provoquant une fixation énergique des toxines dans le protoplasma leucocytaire qui mettrait en jeu une activité destructive.

Ehrlich (1) donne de cette action une explication un peu compliquée. Pour lui, la molécule de toxine se composerait de deux groupements, un *groupe haptophore* et un *groupe toxophore*. Le groupe haptophore, très stable, non toxique, fixerait l'antitoxine. Le groupe toxophore perdrait vite ses propriétés toxiques et finirait par se transformer en produits peu actifs, les *toxones*, ou tout à fait inertes, les *toxoïdes*. Les toxoïdes et les toxones seraient des toxines dont le groupe toxophore est ainsi modifié et qui gardent intact leur groupe haptophore. C'est le groupe haptophore qui, introduit dans l'organisme, produit l'immunité.

Ce qui paraît certain aujourd'hui, c'est la fixation des antitoxines sur les toxines, fixation qui produit une sorte de neutralisation de leurs affinités, sans toutefois les détruire.

Nous reviendrons encore plus loin sur les antitoxines à propos de l'immunité.

Opsonines.

L'existence, dans le sérum, de produits activant la phagocytose a été signalée depuis longtemps ; Metschnikoff (2) avait remarqué l'action véritablement stimulante des sérums spécifiques sur la phagocytose et admis qu'elle était due à des substances spéciales, les *stimulines*, qui agissaient directement sur les phagocytes. Plus tard, Wright et Douglas (3), observant la phagocytose du *Staphylocoque doré* par les leucocytes normaux, ont remarqué que sans sérum il ne se produisait presque pas de phagocytose. On a même nié la *phagocytose spontanée*, se produisant sans l'action de ces activants spéciaux ; les expériences de Metschnikoff et de Löhlein (4) montrent qu'il faut réellement l'admettre. Les globules blancs du sang, en particulier, possèdent bien la

(1) Ehrlich, Mode de production et action des antitoxines (*Sem. méd.*, 6 décembre 1899). — Die Schutzstoffe des Blutes (*Deutsche med. Wochenschr.*, 26 décembre 1901). — Ehrlich et Sachs, Ueber die Vielheit des Complemente des Serums (*Berl. klin. Wochenschr.*, 1902, n[os] 14 et 15).

(2) Metschnikoff, L'immunité dans les maladies infectieuses, 1901.

(3) Wright et Douglas, On the action exerted upon the Staphylococcus pyogenes by human blood fluid and on the elaboration of protective elements in the human organism in response to the inoculation with a Staphylococcusvaccine (*Proceed. Roy Soc.*, 1904, LXXIV, p. 147).

(4) Löhlein, Sur la phagocytose *in vitro* des microbes pathogènes (*Ann. de l'Inst. Pasteur*, 1905, XIX, p. 647, et 1906, XX, p. 939).

propriété de phagocyter certaines espèces de Bactéries sans le secours d'aucun élément ou produit étranger. Mais on doit reconnaître qu'il existe des substances qui facilitent la phagocytose ou l'excitent lorsqu'elle peut être faible ou insuffisante.

De telles substances sont certainement beaucoup plus abondantes et plus actives dans les sérums d'animaux immunisés. En étudiant le phénomène de Pfeiffer (p. 133), on remarque qu'il y a, dans les résultats observés, une différence considérable entre le cobaye normal et le cobaye immunisé. Dans le cobaye immunisé, il se fait une destruction rapide des Vibrions, il s'opère en particulier une phagocytose intense; dans le cobaye neuf, la phagocytose est faible, peu marquée. Les phagocytes sont donc influencés dans le premier cas.

On doit conclure que, sous l'influence de l'invasion microbienne, de l'infection, il se forme dans le sérum des produits qui influencent à un très haut degré la phagocytose. Wright et Douglas (1), qui ont tout spécialement attiré l'attention sur ces substances, les ont dénommées *opsonines*, (de οψονεω, je prépare), montrant qu'elles se fixent sur les microbes, sans que des lavages répétés puissent les enlever, et qu'elles les disposent, les préparent, les mordancent pour ainsi dire, pour subir l'action des phagocytes; elles les sensibilisent à subir cette action.

De telles substances existent aussi dans le sérum normal, mais en proportions moindres et avec des qualités un peu différentes, comme il sera dit plus loin.

On est peu fixé sur la nature de ces opsonines, qui doivent probablement être considérées comme des corps voisins des précédents. Elles paraissent associées aux globulines du sérum. Les opsonines des sérums immunisants sont thermostabiles, résistent trente minutes à un chauffage à 56° ; une chauffe de dix minutes à 60° les détruit. Celles des sérums normaux, thermolabiles, sont détruites par le chauffage à 56°. Lorsqu'on fait d'abord agir les sérums opsonisants sur les microbes, ceux-ci subissent leur action préparatoire ; si l'on vient alors à faire agir la température dans les limites indiquées, la phagocytose s'opère comme avant chauffage. Wright et Douglas donnent les chiffres suivants pour montrer l'influence de la chaleur :

Nombre moyen par leucocyte de Bactéries phagocytées.

Avant chauffage				12,7
Après chauffage	à 45°	pendant	dix minutes	13,1
—	à 50°	—	—	10,2
—	à 55°	—	—	5,7

Le pouvoir opsonisant semble être une qualité assez fragile; même à l'obscurité, le sérum perd graduellement son activité qui se trouve diminuée de près de 50 p. 100 après cinq ou six jours.

Bien des auteurs, Wright et Douglas principalement, sont partisans de la spécificité rigoureuse des opsonines. Pour eux, suivant les besoins, suivant l'excitation du microbe spécial, l'organisme réagit en produisant exclusivement telle opsonine correspondante, qui favorise la phagocytose à l'égard du microbe qui est intervenu. D'autres, au contraire, ne

(1) Wright et Douglas, Further observations on the role on the Blood fluids in connection with Phagocytosis (*Proceed. of royal Society*, 1904, LXXVIII, p. 128).

reconnaissent à l'action aucune spécificité, assurent que les opsonines produites se fixent indifféremment sur n'importe quels microbes qu'elles sensibilisent pour la phagocytose. Il faut cependant reconnaître qu'il y a des cas où l'augmentation du pouvoir opsonisant se fait bien nettement pour le microbe qui a fourni le sérum opsonisant; c'est surtout le cas pour le *Bacille typhique*, comme l'a fait remarquer Milhit (1). On peut donc reconnaître aux opsonines une spécificité relative.

Leur origine est encore douteuse. Pour Metschnikoff et Levaditi, elles sont manifestement d'origine leucocytaire. Ce n'est pas suffisamment démontré. On peut penser que les leucocytes en produisent réellement, mais d'autres éléments aussi, peut-être ceux de l'endothélium vasculaire.

D'après ce qui a été dit sur la spécificité des opsonines, on voit que leur individualité même peut être raisonnablement mise en jeu. Il y a en effet des raisons pour les rapprocher dans certains cas de l'alexine; les opsonines des sérums normaux sont thermolabiles comme elle, puis Levaditi et Inmann (2) ont montré que les propriétés opsonisantes des sérums normaux paraissaient dépendre de leur teneur en alexine. D'un autre côté, des expériences de Sawtschenko (3) tendent à prouver que les opsonines des sérums immunisants, plutôt thermostabiles et déterminant une fixation spécifique, sont ou identiques ou intimement liées avec les sensibilisatrices.

Il se peut même que l'on n'ait pas affaire, dans ce cas, à des produits spéciaux formés dans les sérums, mais à des propriétés renforcées ou exaltées sous l'influence des actions qui interviennent, à un *pouvoir opsonique* ou *opsonisant*, plutôt qu'à des substances propres formées dans ces conditions par l'organisme attaqué.

Outre son importance théorique, la constatation de ces faits peut être d'un grand intérêt pratique. Comme il semble y avoir rapport entre l'apparition et le développement de ces opsonines ou de ce pouvoir opsonisant, son intensité, ses variations, et le degré de résistance de l'organisme à l'infection, on peut, en clinique, tirer de telles données d'excellentes indications dans différents cas. Ce sont de très bons renseignements pour établir le pronostic. Il est aussi possible de suivre à leur aide les variations de résistance de l'organisme à l'égard de microbes ou de produits microbiens introduits dans un but thérapeutique; Wright en a tiré d'importantes déductions au point de vue de l'injection de vaccins microbiens divers ou de tuberculine.

La manière de faire pour arriver à la constatation de ces faits, la critique et la valeur des résultats obtenus, seront exposées plus loin, lors de l'étude de la Technique bactériologique.

Toutefois, les microbes et les substances microbiennes ne semblent pas seuls à intervenir dans la production des opsonines; des substances chimiques, les métaux colloïdaux par exemple (4), peut-être même cer-

(1) Milhit. Spécificité des opsonines. Diagnostic opsonique de la fièvre typhoïde (*Arch. de méd. expér.*, 1908, XX, p. 401).

(2) Levaditi et Inmann, Contributions à l'étude des opsonines; mécanisme de l'opsonisation (*C. R. de la Soc. de Biol.*, 1907, LXII, p. 683, 725, 817 et 869).

(3) Sawtschenko. Du rôle des immunisines (fixateurs) dans la phagocytose (*Ann. de l'Inst. Pasteur*, 1902, XVI, p. 106).

(4) Bossan et Marcelet, Les métaux colloïdaux. Étude sur leur action et leur effet sur le pouvoir phagocytaire (*Gaz. des hôpitaux*, 10 sept. 1908).

taines actions physiques, semblent agir dans le même sens. C'est un appoint pour la thérapeutique des infections.

Les *bactériotropines* de Neufeld (1) ne paraissent pas devoir être distinguées des opsonines.

Cependant, à côté des fonctions de défense que peut mettre en jeu l'organisme attaqué, il existe des actions qui vont directement à leur encontre, qui contrarient la résistance de l'organisme, s'opposant à la phagocytose ou allant contre l'action des substances bactéricides. Ces effets contrariants peuvent provenir du microbe introduit ou de l'organisme lui-même.

Il en est ainsi, par exemple, de ces *produits solubles prédisposants* dont il a été question précédemment (p. 127). De tels produits semblent surtout agir en diminuant l'activité des phagocytes. La *leucocidine*, trouvée par Van de Velde (2) dans les sécrétions du *Staphylocoque doré*, s'attaque aux globules blancs dont elle provoque la dégénérescence et la mort. Cette leucocidine est thermolabile, détruite aux environs de 58°.

Dans cette catégorie de substances doivent rentrer aussi les *aggressines* de Bail (3). Ce sont des produits que les microbes pathogènes sécrètent dans l'organisme vivant, possédant le rôle évident de combattre les moyens de résistance que fait agir l'organisme frappé. Tous les microbes pathogènes n'en forment pas ; Bail en a reconnu chez le *Bacille typhique*, le *Colibacille*, le *Vibrion du choléra*, le *Staphylocoque doré*, le *Bacille du choléra des poules*, le *Bacille de la peste porcine*. Pour Wassermann et Citron, des aggressines pourraient également se former hors de l'organisme, dans les cultures, au moins pour certains de ces microbes. Pour remplir leur rôle, les cellules phagocytaires doivent être protégées contre ces aggressines microbiennes par un renforcement de leur activité.

Tchistowitch et Yourévistsch (4) ont reconnu que les cultures virulentes de *Pneumocoque* et de *Bacille du choléra des poules* contiennent des substances qui défendent ces microbes contre la phagocytose, substances spécifiques, n'empêchant la phagocytose que pour l'espèce microbienne dont elles proviennent. Ils les nomment *antiphagines*.

Il y a opposition entre ces substances empêchant la phagocytose, aggressines et antiphagines, et celles qui la favorisent, les opsonines en particulier. Le résultat dépend des proportions et de l'activité des produits mis en présence.

Ces actions contraires peuvent être le fait de l'organisme attaqué. Après une première atteinte, un organisme peut devenir plus sensible à un microbe ou à ses poisons. C'est une explication que l'on peut donner des faits d'*anaphylaxie* dont il sera parlé plus loin à propos de l'immunité.

(1) Neufeld, Ueber bakteriotrope Immünstoffe (*Med. Klinik*, 1908). — Ueber Abtodtung der Bakterien innerhalb der Leucocyten (*Mikrobiol. Ver.*, 1908).

(2) Van de Velde, Étude sur le mécanisme de la virulence du Staphylocoque pyogène (*La Cellule*, XI, fasc. 2).

(3) Bail, Fortschrite in der Erforschung der Bakterienaggressivität (*Berl. klin. Wochenschr.*, 1907, n° 24).

(4) Tchistowitch et Yourévitsch, Sur les opsonines et les antiphagines dans l'infection pneumococcique (*Ann. de l'Inst. Pasteur*, XXII, 1908, p. 611). — Tchistowitch, Sur les antiphagines du microbe du choléra des poules (*Ibid.*, XXIII, 1909, p. 834).

D'après ce qui vient d'être exposé, la résistance de l'organisme à l'infection peut apparaître comme un phénomène bien complexe, où interviennent des actions multiples et variées, pour une part qui est loin d'être nettement déterminée pour chacune d'elles. La phagocytose et l'action bactéricide des humeurs doivent de beaucoup se placer au premier rang. Ces deux processus consistent évidemment dans la mise en jeu d'activités propres de l'organisme ; on doit leur reconnaître un fond commun évident, c'est la grande importance des leucocytes, qui sont, d'un côté, les éléments phagocytaires de beaucoup les plus actifs, et qui, d'un autre côté, semblent bien produire sinon toutes les substances à action bactéricide, du moins les plus importantes d'entre elles. Dès lors, l'action bactéricide deviendrait l'un des termes de la phagocytose, qui apparaîtrait réellement comme le processus fondamental de la défense de l'organisme. Les leucocytes seraient les véritables agents de défense de ce dernier. Pour satisfaire à ce rôle, ils usent de leur extrême sensibilité à toutes les actions mises en jeu ; attirés par leur chimiotaxie, excités par les opsonines, aidés par toutes ces substances, alexine et sensibilisatrices, agglutinines, précipitines, antitoxines, produites dans le but adjuvant voulu par l'organisme ou souvent par eux-mêmes, ils se dirigent par leurs mouvements actifs vers les microbes qu'ils englobent, tuent et digèrent, ou vers les toxines qu'ils détruisent. Leur très grand nombre, leur production facile dans un organisme actif, leur transport aisé à l'endroit voulu, sont ici des conditions précieuses ; leur action peut encore se faire sentir au loin par la diffusion de leurs sécrétions bactéricides. L'action des différents organes serait plutôt secondaire et dépendrait probablement de la leucocytose qui peut s'y opérer (1).

Les différents organes paraissent avoir, au point de vue de l'infection, un rôle des plus important. Ceux dont l'influence est le plus manifeste sont les plus riches en réseaux vasculaires, probablement parce que les microbes introduits dans la circulation s'arrêtent dans le premier réseau capillaire qu'ils rencontrent et subissent alors plus facilement et plus longtemps l'action de l'organe où ils se trouvent.

L'effet produit varie beaucoup suivant l'organe et aussi suivant le microbe. Il est encore difficile d'énoncer des règles générales sur ce point.

L'agent infectieux peut arriver par la voie lymphatique ou par la voie sanguine ; il rencontre, suivant les cas, des organes bien différents.

Les *ganglions lymphatiques* paraissent avoir, à l'égard de l'organisme, un rôle de protection des plus important (2). Ce sont réellement des organes d'arrêt pour les microbes ou leurs produits. Les microbes peuvent y séjourner longtemps, leur destruction s'y faisant lentement ; ils peuvent passer au delà : l'expérience démontre alors que leur virulence est notablement diminuée ; ils peuvent y vivre, s'y développer,

(1) Wauters, Sur la répartition des substances bactéricides dans les différents organes (*Arch. de méd. expér.*, X, 1898, p. 751).

(2) Perez, Ueber das Verhalten des Lymphdrüsensystems den Mikroorganismen gegenüber (*Centralbl. für Bakt.*, XXIII, 1898, p. 404). — Besançon et Labbé, Du rôle du ganglion dans les maladies infectieuses (*Arch. de méd. expér.*, 1898, p. 318).

mais les symptômes produits sont aussi modifiés, diminués : ainsi le *Bacille de Koch* y déterminant une tuberculose atténuée, la véritable scrofule. Ces ganglions sont le siège des mêmes phénomènes réactionnels que ceux qui ont été observés au début de l'infection, au point d'inoculation, congestion, leucocytose, diapédèse : ils réagissent comme tout l'organisme ; c'est en somme ici aussi la phagocytose qui est le grand facteur.

Le rôle de la *rate* est plus obscur (1). On observe de grandes différences suivant les infections. Cet organe paraît être tantôt utile, tantôt nuisible à la défense, très probablement suivant la nature des produits qu'il sécrète. Dans bien des expériences, l'extirpation de la rate, ou la ligature de son pédicule vasculaire, atténue la gravité des infections microbiennes ; son action paraît donc plutôt défavorable dans l'infection. Par contre, l'organe ne paraît avoir aucune action sur les toxines introduites dans le sang.

La *moelle osseuse*, où se produisent en quantité les leucocytes polynucléaires, serait un des organes de défense les plus importants.

L'*appareil digestif* a certainement un rôle protecteur. L'estomac agit nettement dans ce sens, d'abord par l'acidité du suc gastrique, qui paraît bien entrer en ligne de compte, quoi qu'on en dise. L'intestin met en jeu l'action de l'épithélium de la muqueuse et ses sécrétions. De plus, l'estomac et l'intestin agissent sur les toxines en les détruisant ou en les atténuant (2).

L'action protectrice du *foie* paraît bien évidente. Les expériences de Roger démontrent qu'il arrête et détruit certains microbes, le *Bacille du charbon* et le *Staphylocoque doré* ; par contre, il favoriserait le *Streptocoque*. Le jeûne et la mauvaise alimentation diminuent le rôle protecteur (3).

La sécrétion du *pancréas* atténue notablement les toxines, d'après Charrin (4).

Le *poumon* a une action protectrice marquée à l'égard du *Streptocoque*, d'après Roger (5).

Les organes d'élimination jouent aussi un grand rôle dans la défense.

Le *rein* vient en première ligne. Son importance est absolument démontrée par les désordres observés à la suite de la rétention des poisons urinaires d'origine microbienne évidente. L'élimination des Bactéries pathogènes pour le rein est démontrée depuis longtemps. Petruschky (6) fait jouer au rein, dans la fièvre typhoïde, le rôle prédominant pour

(1) Courmont et Duffau, Du rôle de la rate dans les infections (*Arch. de méd. expér.*, 1898, p. 430). — Blumreich et Jacobi, Ueber die Bedeutung der Milz bei künstlichen und natürlichen Infectionen (*Zeitschr. für Hygiene*, XXIX, 1898, p. 419).

(2) Charrin, Action des sucs digestifs sur les toxines (*Soc. de Biol.*, 30 juillet 1898).

(3) Roger, Action des organes sur les microbes (*Soc. de Biol.*, 12 mars 1898). — De l'action protectrice du foie (*Ibid.*, 15 octobre 1898). — Roger et Garnier, Influence du jeûne et de l'alimentation sur le rôle protecteur du foie (*Ibid.*, 18 mars 1899).

(4) Charrin, Action du pancréas sur les toxines (*Soc. de Biol.*, 18 mars 1893).

(5) Roger, Sur le rôle protecteur du poumon contre l'infection streptococcique (*Soc de Biol.*, 23 octobre 1897).

(6) Petruschky, Ueber Massenausscheidung von Typhusbacillen durch den Urin von Typhus Rekonvalescenten und die epidemiologische Bedeutung dieser Thatsache (*Centralbl. für Bakt.*, XXIII, 1898, n° 577).

l'élimination bacillaire ; Bield et Kraus (1) lui reconnaissent aussi un grand rôle pour d'autres infections, alors qu'ils n'ont rien observé pour les glandes salivaires et le pancréas. D'après Rolly (2), les reins normaux pourraient souvent laisser passer des microbes. D'autres expérimentateurs sont d'un avis contraire et disent que le passage ne se fait qu'à la suite de lésions pathologiques de l'organe (3).

Kriklivy (4) n'a rien obtenu pour la *sueur* avec le *Bacille du charbon*.

Le degré de résistance à un même parasite peut varier dans des limites très larges suivant l'espèce, la variété, la force de l'individu ou simplement son âge. Ainsi, on voit la souris des champs résister à une septicémie qui tue la souris de maison, bien voisine d'elle cependant. Un exemple plus frappant encore est offert par la résistance au charbon d'une race de moutons d'Algérie, les moutons *barbarins*, ne différant en rien de leurs congénères d'Europe (5). L'âge est un des facteurs dont l'influence est le plus manifeste : le chien, très sensible au charbon lorsqu'il est jeune, devient rapidement réfractaire avec l'âge. Bien des cultures atténuées de Bactéries pathogènes, sans action sur les animaux adultes, en gardent une très manifeste sur les jeunes, et d'autant plus forte qu'ils sont moins âgés. La raison de la résistance de ces organismes n'est guère connue. Elle tient peut-être à l'état du sang qui, plus riche, pourrait soutenir plus longtemps la lutte. D'après P. Bert (6), le sang des animaux originaires des hauts lieux présente une capacité d'absorption pour l'oxygène bien supérieure à celle des animaux des régions basses. C'est peut-être cette forte proportion d'oxygène qui permet aux moutons barbarins de résister si complètement à l'invasion de la Bactérie charbonneuse. La différence dans les processus phagocytaires ou l'action bactéricide des humeurs peut jouer un rôle.

Dans un même organisme, il peut y avoir lutte entre des espèces différentes. D'habitude, l'une se développe plus vite et parvient à étouffer ses voisines ou, tout au moins, à diminuer et masquer leur action.

C'est, du reste, ce que l'on observe souvent dans les cultures où plusieurs espèces sont mélangées ou ensemencées ensemble intentionnellement; beaucoup de Bactéries exercent sur d'autres une action nuisible manifeste. Ce fait d'*antagonisme* a été signalé en premier lieu par Garré (7) qui, en expérimentant avec les cultures sur milieux solides,

(1) Bield et Kraus, Ueber die Ausscheidung der Mikroorganismen durch drüsige Organen (*Zeitschr. für Hygiene*, XXVI, 1897, p. 353).

(2) Rolly, Zur Frage der Durchgangigkeit der Niere für Bakterien (*Münch. mediz. Wochenschr.*, 1909, p. 1873).

(3) Opitz, Beiträge zur Frage der Durchgängigkeit von Darm und Nieren für Bakterien (*Zeitschr. für Hygiene*, XXIX, 1898, p. 505). — Métin, Note sur l'élimination des Bactéries par les reins et le foie (*Ann. de l'Inst. Pasteur*, XIV, 1900, p. 415). — Von Klecki et Wrozek, Zur Frage der Ausscheidung von Bakterien durch die normale Niere (*Arch. für exper. Pathol.*, LIX, 1908, p. 145).

(4) Kriklivy, Sur l'élimination des microorganismes pathogènes par la sueur (*Wratsch*, 1897, n° 8).

(5) Chauveau, De la prédisposition et de l'immunité pathologiques (*C. R. de l'Acad. des sc.*, LXXXIX, 1879, p. 498).

(6) P. Bert, *C. R. de l'Acad. des sc.*, XCIV, 1882, p. 805.

(7) Garré, Ueber Antagonisten unter Bacterien (*Correspondenzbl. für Schweizer Aertze*, XVII, 1887).

avait remarqué que le milieu, débarrassé par raclage de la culture, était devenu impropre à la vie d'autres Bactéries. Freudenreich (1) approfondit le même sujet en se servant, comme milieu de culture, de bouillon où il ensemençait une certaine espèce, attendait son développement complet, puis filtrait sur une bougie Chamberland ; le liquide stérile lui servait alors à ensemencer d'autres espèces. Pour beaucoup d'espèces, le développement était nul ou faible ; d'autres, au contraire, ne semblaient pas influencées. Soyka (2) a obtenu des résultats très semblables.

L'effet antagoniste semble être dû à des causes diverses. Une première, signalée depuis longtemps, est la soustraction d'oxygène qu'une espèce opère dans un mélange d'aérobies plus rapidement que les autres. Lorsqu'une espèce parvient à former à la surface d'un bouillon de culture un voile continu, s'il existe dans la masse du liquide d'autres espèces qui ne peuvent s'adapter à la vie sans air, elles tombent en vie latente ou périssent souvent. Mais, d'après les expériences citées précédemment, la cause la plus commune de cet effet nuisible est la production dans le milieu de culture de substances excrétées par la Bactérie, substances qui peuvent être nuisibles à un haut degré pour toutes les autres espèces ou pour certaines seulement.

C'est ce que Guignard et Charrin (3) ont démontré en cultivant ensemble le *Bacille du pus bleu* et le *Bacille du charbon*. Le premier de ces microorganismes prend rapidement le dessus ; le second dégénère d'abord, puis disparaît. Le même résultat s'obtient en ensemençant une grande quantité de culture charbonneuse dans les produits solubles du *Bacille du pus bleu*.

L'antagonisme de ces deux espèces ne se montre pas seulement dans les cultures, mais encore dans l'organisme animal : Bouchard a montré que leur inoculation simultanée au lapin détermine dans la moitié des cas une survie de l'animal, alors que l'inoculation du charbon seul est régulièrement mortelle.

Une espèce donnée peut aussi se rendre un milieu impropre. Chantemesse et Widal (4) l'ont remarqué pour le *Bacille typhique*. Si l'on vient à enlever, par un raclage soigné, le produit d'une culture de ce microbe à la surface de la gélatine et que l'on ensemence à nouveau ce même milieu, on n'y observe aucun développement. Ce fait, il est vrai, ne se rencontre pas pour toutes les espèces ; ainsi Pasteur a annoncé depuis longtemps que le *Bacille du charbon* se développait bien dans des bouillons charbonneux débarrassés de leurs éléments vivants par filtration sur porcelaine. Cette même Bactérie, du reste, a donné à Freudenreich des résultats positifs avec tous les bouillons de culture qu'il a expérimentés, sauf avec celui du *Spirille du choléra*.

Dans d'autres cas, il semble au contraire que certaines espèces facilitent, en particulier dans l'organisme animal, le développement

(1) Freudenreich, De l'antagonisme des Bactéries et de l'immunité qu'il confère aux milieux de culture (*Ann. de l'Inst. Pasteur*, 1888, p. 200).

(2) Soyka, Die Entwickelung von pathogenen Spaltpilzen unter dem wechselseitigen Einfluss ihrer Zersetzungsprodukte (*Fortschr. der Med.*, 1888, p. 769).

(3) Guignard et Charrin, *C. R. de l'Acad. des sc.*, 8 avril 1889.

(4) Chantemesse et Widal, Recherches sur le Bacille typhique et l'étiologie de la fièvre typhoïde (*Arch. de physiol.*, 1887).

d'autres, ou au moins exaltent leurs effets. Il existe une véritable *association microbienne* (1) entre de telles espèces. Roger (2) en a cité un cas très intéressant. Le lapin est réfractaire aux inoculations de *Bacille du charbon symptomatique*. Vient-on à mélanger une goutte d'une sérosité contenant cet agent infectieux à 1 centimètre cube d'une culture de *Micrococcus prodigiosus*, qui seul ne détermine presque rien chez le lapin à de plus fortes doses, l'animal succombe en moins de vingt-quatre heures. On peut stériliser la culture de *Micrococcus prodigiosus* par un chauffage à 104° sans que le résultat soit modifié ; il est donc causé par la présence d'une substance soluble supportant cette haute température sans se décomposer. Monti (3) a même observé que les produits solubles sécrétés par certaines Bactéries saprophytes, entre autres le *Proteus vulgaris*, commun dans les putréfactions animales, pouvaient, par leurs inoculations, renforcer la puissance nocive de certaines espèces pathogènes, qui s'était affaiblie sous des influences diverses.

Tout ceci se comprend depuis que l'on sait que les Bactéries produisent souvent des substances diffusibles qui ont pour effet de diminuer, d'une façon générale, la résistance d'un organisme, en contrariant la phagocytose ou en amoindrissant la puissance bactéricide du sang.

Dans ces *associations microbiennes*, on peut rencontrer en présence une espèce pathogène et des saprophytes ordinairement inoffensifs (4) qui agissent indirectement, comme nous l'avons vu, ou plusieurs espèces pathogènes ; dans ce dernier cas, celles qui sont moins actives ou qui sont venues en dernier profitent en quelque sorte de la voie ouverte, de la diminution de la résistance de l'organisme due à l'action de la première : il se produit une *infection mixte*.

La *virulence* des espèces pathogènes est une propriété physiologique qui paraît due, nous l'avons vu, dans bien des cas, sinon dans tous, à la production de substances toxiques dont l'action explique, en tout ou en partie, les effets observés ; pour d'autres, elle semble être en rapport plus direct encore avec le développement et la vitalité de l'espèce, du moins dans l'état actuel de nos connaissances. Aussi ne doit-on pas s'étonner de voir que toutes les influences qui diminuent la vitalité d'une espèce atteignent aussi, par cela même, son degré de virulence, qu'elles peuvent diminuer, *atténuer* comme on dit. Nous savons que les spores résistent considérablement à toutes ces actions débilitantes ; pour qu'il y ait *atténuation*, il faut donc qu'il y ait simplement multiplication végétative ; les spores ne s'atténuent pas.

Les agents qui occasionnent l'affaiblissement de l'activité des produits virulents, leur *atténuation*, sont nombreux. Quantité d'agents physiques ou chimiques concourent à ce but dans la nature ou entre les mains des expérimentateurs. Ce que l'on voit le plus souvent intervenir, ce sont des modifications de lumière, de chaleur, de pression, l'influence des substances antiseptiques. Le microbe se trouve soumis à des conditions de vie dysgénésiques qui déterminent souvent de profondes varia-

(1) Héricourt, Des associations microbiennes (*Revue de méd.*, 1888).

(2) Roger, Effets des associations microbiennes (*Soc. de Biol.*, 19 janvier 1889).

(3) Monti, Influenza dei prodotti tossici dei saprofyti sulla restituzione della virulenza ai microparassiti attenuati (*Acc. dei Lincei*, II, 1889, n° 7).

(4) Sacquépée, Infection secondaire produite par le *Bacillus mesentericus* au cours de la fièvre typhoïde (*Ann. de l'Inst. Pasteur*, XV, 1901, p. 261).

tions dans sa manière d'agir et même dans son aspect. L'atténuation peut être poussée très loin, à la limite ; le microbe, pathogène au début, n'apparaît plus alors que comme un simple saprophyte. A des degrés moins avancés, il présente une activité graduellement décroissante que l'on peut fixer d'une manière assez précise en graduant l'action de la cause affaiblissante ; nous verrons que c'est le moyen d'arriver à obtenir des *vaccins* de force déterminée.

Cette atténuation des propriétés virulentes des espèces pathogènes peut être passagère, dépendant alors probablement d'une diminution de la puissance nutritive du milieu qui s'épuise plus ou moins vite par la vie de la Bactérie, ou de l'âge des éléments du microbe. Dans ce cas, il peut suffire, pour conserver la virulence entière, de rajeunir la culture au moment voulu, en l'ensemençant dans un milieu neuf. Mais l'atténuation est souvent permanente, acquise ; elle se transmet intacte dans les cultures nouvelles, si l'influence atténuatrice vient à être suspendue. Les Bactéries peuvent même alors produire des spores, qui, elles aussi, ne reproduiront plus que des cultures atténuées au même degré ; c'est une véritable *race* qui se crée. Même chez certaines espèces, comme la *Bactérie du charbon*, où il est possible de graduer l'atténuation en faisant varier l'action de la cause atténuatrice, les cultures atténuées gardent et reproduisent, dans les ensemencements obtenus avec elles, le degré exact d'atténuation auquel elles ont été amenées.

L'atténuation obtenue, il est cependant possible, pour certaines espèces, de leur faire regagner leur virulence normale. Cette *récupération de virulence* peut s'obtenir par des procédés très divers (1).

Pasteur a montré le premier qu'il était possible, en usant de certains artifices, de renforcer une virulence très affaiblie ou prête à s'éteindre et de voir revenir progressivement à sa puissance première une Bactérie pathogène très atténuée, devenue presque inerte. Il avait reconnu, dans ses belles recherches sur la maladie charbonneuse, que les cultures du *Bacille du charbon*, maintenues à 43° en présence de l'air en abondance, perdaient peu à peu leur virulence, de façon à n'avoir plus d'action sensible, au bout d'une huitaine de jours, sur les cobayes, qui sont cependant d'une réceptivité si grande à l'égard du charbon. En choisissant le moment convenable, une telle culture, sans action sur le cobaye adulte, peut encore tuer un individu de résistance moindre, le cobaye nouveau-né par exemple. Or, par ce passage dans l'organisme animal, le virus s'est légèrement renforcé, de telle sorte que le sang de l'individu mort pourra tuer un cobaye un peu plus fort, d'un jour ou deux ; puis, en opérant de même, il sera possible de faire périr un cobaye de quelques jours, de huit jours, de quinze jours, d'un mois. Et ainsi de suite, petit à petit, après une période assez longue et des passages assez nombreux, on arrivera à du virus mortel pour un cobaye adulte de plus en plus fort, pour le lapin, et enfin pour le mouton lui-même. La Bactérie est revenue à sa virulence primitive, qu'elle gardera si l'on n'intervient pas pour l'atténuer.

Il est possible, en usant de milieux de culture tout à fait inertes, d'observer un renforcement dans la puissance virulente de certaines

(1) Macé, Sur la récupération de la vitalité des cultures de Bactéries par passages sur certains milieux (*Soc. des sc. de Nancy*, 1888).

Bactéries pathogènes, qui s'est atténuée sous l'influence de causes diverses.

Duclaux en a cité un premier exemple pour les cultures d'un *Micrococcus*, qu'il a obtenues du sang de malades atteints de l'affection connue sous le nom de *Clou de Biskra*. Les cultures dans le bouillon de cette Bactérie perdent leur virulence avec l'âge. Une culture de trois à quatre jours est en pleine virulence; une de dix jours la montre déjà bien amoindrie. Une culture de deux mois est tout à fait inoffensive, même à fortes doses. Toutefois, si l'on ensemence du bouillon frais avec une de ces cultures inertes, mais encore vivantes, la culture que l'on obtient récupère en quelques jours la virulence primitive. La virulence paraît ici intimement liée au rajeunissement des éléments.

Un fait beaucoup plus net de récupération de virulence s'observe chez une Bactérie, isolée et étudiée par Legrain dans mon laboratoire, qui, introduite dans l'organisme des grenouilles, détermine chez ces animaux à la fois des accidents locaux, des phlegmons gangreneux surtout, et des accidents généraux de nature septicémique, rapidement mortels. Cette espèce se cultive facilement sur tous les milieux. Les cultures sur gélatine et sur gélose perdent en très peu de temps leur virulence et deviennent sans action sur les grenouilles. Celles sur pomme de terre gardent très longtemps leur activité. Elles sont très abondantes et ont une odeur particulière, ne s'observant pas sur les autres milieux, qui rappelle assez l'odeur de la cicutine. En ensemençant sur pomme de terre des cultures sur gélatine ou gélose devenues tout à fait inertes, on voit la virulence revenir rapidement et regagner, après trois ou quatre ensemencements successifs, son maximum d'intensité.

Le *Streptocoque pyogène*, si répandu dans la nature, qui se dépouille si vite de toute virulence, doit bien certainement, pour déterminer les nombreux accidents qu'il occasionne, récupérer très rapidement sa puissance infectieuse et même la voir s'exalter sous des influences qui nous échappent encore complètement, mais qui sont peut-être voisines de celles qui viennent d'être mises en cause; il en est de même du *Pneumocoque*.

Monti (1) a observé une restitution de la virulence à des microbes pathogènes atténués, lorsqu'on vient à inoculer en même temps qu'eux des produits toxiques sécrétés par certains saprophytes. De tels produits du *Proteus vulgaris*, par exemple, renforcent considérablement la virulence de cultures très atténuées de Pneumocoques et de microbes de l'érysipèle. Il y aurait aussi bien à faire la part de l'affaiblissement de l'organisme occasionné par les substances toxiques qu'à mettre en cause une restitution de la virulence propre à l'espèce; c'est ce que démontrent certaines expériences de Galtier (2).

La virulence en quelque sorte normale d'une espèce peut parfois s'accroître, *s'exalter* sous certaines influences. Les passages consécutifs, multipliés, dans des organismes réceptifs tiennent le premier rang parmi les procédés qui peuvent produire une *exaltation* de virulence. C'est surtout dans les infections déterminées par l'inoculation de produits

(1) Monti, Influenza dei prodotti tossici dei saprofyti sulla restituzione della virulenza ai microparassiti attenuati (*Acc. dei Lincei*, II, 1889, n° 7).

(2) Galtier, Nouvelles recherches sur l'influence des associations bactériennes (*C. R. de l'Acad. des sc.*, CXVIII, 1894, p. 1001).

septiques, particulièrement ceux qui renferment du *Streptocoque pyogène* très virulent, que l'augmentation de virulence devient évidente. Ce fait, très important, a été signalé depuis longtemps par Coze et Feltz (1) qui, dès 1872, avaient établi que « la septicité augmente par la culture du ferment dans les organismes vivants ». Les découvertes ultérieures n'ont fait que confirmer leur opinion. On sait aujourd'hui que pour plusieurs Bactéries pathogènes, en usant d'une longue série de passages dans des animaux d'expérience particulièrement réceptifs, on peut atteindre une virulence considérablement supérieure à celle que l'on est porté à considérer comme normale.

Les voies par lesquelles l'agent infectieux arrive dans l'économie sont diverses. Il peut y avoir transmission directe d'un individu à l'autre, la Bactérie en cause ne se développant pas en dehors de l'organisme ; c'est la *contagion*. Plus souvent, cette Bactérie peut vivre, au moins à l'état de vie latente, dans le milieu extérieur, étant indifféremment parasite ou saprophyte ; c'est alors par l'intermédiaire de ce milieu que se fait l'invasion ; la maladie est causée par l'*infection* de l'organisme.

Le point de pénétration des microbes pathogènes dans l'organisme est variable. Deux voies surtout leur sont ouvertes, la peau et les muqueuses. Normalement, ces surfaces sont recouvertes d'un enduit protecteur, épiderme ou couche épithéliale, qui les protège d'ordinaire contre l'invasion microbienne; de plus, dans le tissu conjonctif qui supporte cette couche protectrice se trouvent un grand nombre d'éléments cellulaires doués d'un pouvoir phagocytaire énergique dont l'action vient encore appuyer celle de la couche épithéliale. Lorsque, pour une cause ou pour une autre, la vitalité de ces couches protectrices est atteinte en certains endroits, elles ne suffisent plus à leur tâche, les microbes peuvent pénétrer par ces points faibles. Pour la peau, il faut souvent une telle porte d'entrée, lésion quelconque, souvent minime. D'autres fois, le microbe pathogène semble pouvoir pénétrer directement à travers la peau saine; c'est ce qui résulte des expériences de Garré (2) avec le *Staphylocoque doré*, de Babès (3) avec le *Bacille de la morve*, de Wasmuth (4) avec les *Staphylocoques pyogènes* et le *Bacille du charbon*, de Courmont et Lesieur (5) avec le *Bacille de la tuberculose*. Il semble que le lieu de pénétration est la gaine des poils ; les glandes sébacées ou sudoripares ne joueraient aucun rôle. La peau qui a été rasée n'a plus les caractères d'une peau normale ; elle est dépourvue, par places, de plans épidermiques et est par conséquent plus facilement attaquable. La surface pulmonaire, la surface des voies digestives sont exposées de la même manière ; depuis longtemps Koch a démontré que le poumon et l'intestin sains pouvaient être la porte d'entrée de l'infection charbonneuse quand elle se faisait par des spores; on sait qu'il peut en être de même pour l'infection tuber-

(1) Coze et Feltz, Recherches cliniques sur les maladies infectieuses. Paris, J.-B. Baillière, 1872.

(2) Garré, Zur Aetiologie acut. eitriger Entzündungen (*Fortschr. der Med.*, 1885, n° 6).

(3) Babès, *Bull. de l'Acad. de méd.*, 20 mai 1890.

(4) Wasmuth, Die Durchgängigkeit der Haut für Mikroben (*Centralbl. für Bakt.*, XII, 1892, p. 824).

(5) Courmont et Lesieur, Passage du Bacille tuberculeux à travers la peau chez le cobaye, le veau et le lapin (*Soc. de Biol.*, 22 juin 1907).

culeuse (1). L'agent pathogène de la rage, encore actuellement inconnu, suit d'ordinaire la voie nerveuse pour pénétrer profondément dans l'organisme.

Le microbe, entré dans l'organisme comme il vient d'être dit, peut pulluler sur place, gagner même de proche en proche, produire une *infection par continuité* ; ou se faire transporter plus loin et produire alors des effets en des points souvent éloignés du lieu de pénétration : c'est l'*infection par métastase*. Il peut alors emprunter deux voies : la voie sanguine, ce qui semble assez rare ; ou, plus communément, la voie lymphatique. La rapidité de la diffusion dépend de la vitesse de la circulation de la lymphe et des barrières que le microbe peut rencontrer sur son trajet, barrières qui sont surtout les organes lymphoïdes, principalement les ganglions lymphatiques, où la phagocytose s'exerce d'une façon très active.

On comprend qu'ici la *quantité* de produit virulent introduite dans l'organisme doit jouer un rôle important ; une quantité très minime peut être détruite complètement par la seule action des processus actifs de l'organisme, et ne produire aucun effet, alors qu'avec une proportion plus forte il subsistera assez de virus pour produire l'infection. Chauveau (2) l'a très bien mis en lumière. On comprend ainsi comment des animaux peuvent résister à de très petites quantités de virus, sans pour cela être absolument réfractaires à ce virus ; c'est affaire de quantité : des doses plus fortes ou massives triompheront de la résistance, comme Chauveau l'a prouvé pour l'inoculation du charbon aux moutons barbarins. Sous le rapport de la quantité d'éléments microbiens pouvant déterminer l'infection, il semble y avoir des variations assez grandes suivant l'espèce employée. Pour certaines espèces, il semble qu'il peut suffire d'un seul microbe pour infecter et faire périr des animaux très sensibles, ce qui serait le cas, d'après Stang, (3) pour le *Bacille du choléra des poules* à l'égard du lapin. Il y aurait probablement production rapide, par le microbe, de produits empêchant la défense de l'organisme, particulièrement la phagocytose. Pour d'autres espèces, il faudrait l'introduction d'un plus grand nombre de microbes pour arriver à surmonter la résistance et à l'emporter.

On observe souvent de notables différences dans l'action d'un même microbe sur l'organisme suivant sa voie d'introduction. Ainsi l'inoculation intraveineuse du virus de la péripneumonie bovine ne détermine aucun accident, bien au contraire crée un état d'immunité ; tandis que l'inoculation sous-cutanée produit d'énormes accidents inflammatoires et souvent la mort de l'animal. On peut observer des phénomènes inverses avec d'autres microbes pathogènes.

L'action pathogène des différents microbes ne doit pas être considérée comme un caractère absolu ; tout au contraire, elle est d'habitude limitée à un certain nombre d'espèces animales, qui sont alors dites

(1) Calmette, Les voies normales de pénétration du virus tuberculeux dans l'organisme (*Bull. de l'Inst. Pasteur*. V, 1907).

(2) Chauveau, Influence des quantités des agents virulents (*C. R. de l'Acad. des sc.*, XC, 23 juin 1880). — Id., De l'atténuation des effets des inoculations virulentes par l'emploi de très petites quantités de virus (*Ibid.*, XCII, 4 avril 1881).

(3) Stang, Zur Kenntniss der Toxinbildung des Bacterium avicidum. Thèse de Berne, 1901.

réceptives à l'égard du microbe en question. D'autres résistent complètement à ses effets pernicieux ; elles sont dites *réfractaires*. Entre l'*état réceptif* évident et l'*état réfractaire*, on trouve bien des degrés intermédiaires ; nous avons vu plus haut que l'état réfractaire peut n'être qu'apparent ; l'infection n'est alors qu'une affaire de quantité de virus. Nous rencontrerons de nombreux exemples d'état réfractaire absolu. Souvent un microbe pathogène pour une espèce animale donnée l'est aussi pour les espèces voisines. C'est loin cependant d'être un caractère constant ; nous savons, par exemple, que la souris des champs est complètement réfractaire au *Bacille de la septicémie de la souris* qui tue si rapidement la souris de maison. Ou bien, un même produit virulent peut occasionner, dans les mêmes conditions, des effets bien divers ; ainsi le *Bacille du choléra des poules* tue rapidement le lapin en inoculation sous-cutanée, tandis que, introduit de la même façon chez le cobaye, il n'y détermine qu'une simple lésion locale, un petit abcès, qui guérit vite.

Chez différents individus d'une même espèce, il existe souvent des conditions spéciales, des *prédispositions individuelles*, qui facilitent ou entravent plus ou moins l'action d'un même microbe pathogène pour cette espèce. On observe journellement que certains individus résistent moins que d'autres à des doses égales d'un même virus. La raison en est certainement dans la différence des processus de défense de l'organisme chez ces individus. Ce sont ces prédispositions individuelles qui font qu'en temps d'épidémie, question d'immunité mise à part, parmi les individus également exposés à l'infection, il en est qui la subissent, d'autres qui y échappent ; le même fait se retrouve, du reste, pour toutes les affections qu'occasionnent les microbes pathogènes.

En connaissant le mode d'action des microbes pathogènes sur l'organisme, on comprend facilement que l'état de réceptivité puisse varier, et souvent dans de larges limites, suivant bien des conditions extérieures ou inhérentes à l'organisme.

Il y a longtemps déjà que Pasteur (1) a démontré qu'on pouvait faire périr du charbon la poule, considérée jusqu'alors comme réfractaire, en abaissant artificiellement sa température par la simple immersion des pattes dans l'eau froide, par exemple ; Gibier (2), d'un autre côté, voit mourir du charbon les grenouilles qui sont maintenues dans de l'eau à 35°, alors qu'à l'état normal les inoculations les plus virulentes sont sans effet sur elles. Dans de telles conditions, l'activité des processus de défense de l'organisme, particulièrement la vitalité des phagocytes, se trouve amoindrie, comme l'observation le démontre amplement, par l'action des causes perturbantes anormales, froid ou chaleur, suivant le cas. Toutes les causes qui débilitent l'organisme peuvent amener des perturbations équivalentes ; de nombreuses expériences prouvent que le jeûne, la fatigue, facilitent considérablement ou aggravent certaines infections ; la présence de produits solubles, sécrétés par d'autres Bactéries, même inertes, a souvent une action favorisante très marquée ; des contusions ou des meurtrissures peuvent produire un même effet favori-

(1) Pasteur, Sur le charbon des poules (*Bull. de l'Acad. de méd.*, 1879, p. 1222).

(2) Gibier, De l'aptitude communiquée aux animaux à sang froid à contracter le charbon par l'élévation de leur température (*C. R. de l'Acad. des sc.*, XCIV, 1882, p. 1605).

sant, comme Nocard et Roux (1) l'ont démontré pour le *charbon symptomatique*. Nul doute alors que pour l'homme le surmenage physique ou intellectuel ne doive être considéré comme une cause prédisposante ou aggravante à l'égard des infections.

Il y a même plus ; de semblables causes débilitantes agissant sur l'organisme peuvent avoir des effets plus éloignés encore. Elles peuvent provoquer la pullulation, en quelque sorte le réveil, de microbes nocifs se trouvant depuis longtemps peut-être dans quelque recoin de l'organisme, à l'état de vie amoindrie ou de vie latente ; c'est le *microbisme latent* (Verneuil) ou l'*infection latente* (Adami). Ainsi, d'après Verneuil, une simple contusion, sans la moindre déchirure superficielle, peut provoquer l'apparition d'une ostéomyélite dont les germes seraient depuis longtemps enfermés dans l'organisme. On sait que sur la surface pulmonaire, sur la muqueuse intestinale, se trouvent souvent à l'état normal des microbes qui peuvent nuire à l'organisme, le *Pneumocoque*, le *Colibacille*, par exemple. Dans les conditions ordinaires, le revêtement épithélial suffit, pense-t-on, pour établir une protection efficace. Que le froid, que d'autres agents physiques ou chimiques viennent à diminuer ou faire disparaître la résistance ou l'intégralité de cette couche protectrice, les germes trouvent une porte d'entrée, l'organisme peut être envahi ; c'est une véritable *auto-infection* qui se produit alors.

Pour l'intestin, en particulier, les expériences de Würtz et Hudelo (2), de Béco (3) démontrent avec évidence que, sous des influences diverses qui toutes déterminent de la congestion intestinale, les microbes qu'il contient, et dont plusieurs sont pathogènes, peuvent pénétrer dans le sang et dans la cavité péritonéale, déterminer ainsi l'infection de l'organisme ; au premier rang de ces agents actifs se trouvent certaines toxines microbiennes. Ficker (4) a démontré que la faim et le surmenage conduisaient au même résultat. Les observations d'Ikonnikoff (5) tendent à admettre que le passage à travers la paroi intestinale ne se fait qu'à la suite de la nécrose de cette paroi, surtout de l'épithélium de revêtement.

D'autres organes se trouvent, au même point de vue, dans des conditions identiques à celles de l'intestin. Le rein donne passage aux microbes quand des toxines l'ont altéré ; il en est de même des glandes. Le placenta, qui, à l'état normal, s'oppose au passage de tout élément microbien, se laisse traverser dès qu'il présente une altération même minime (6) ; il peut alors se produire l'infection du fœtus.

Un caractère spécial à ces *maladies infectieuses*, qui ne présente pas

(1) Nocard et Roux, Sur la récupération et l'augmentation de la virulence de la Bactérie du charbon symptomatique (*Ann. de l'Inst. Pasteur*, 1887, p. 257).

(2) Würtz et Hudelo, De l'issue des Bactéries intestinales dans le péritoine et dans le sang pendant l'intoxication alcoolique aiguë (*Soc. de Biol.*, 26 janvier 1895).

(3) Béco, Pénétration des microbes intestinaux dans la circulation pendant la vie (*Ann. de l'Inst. Pasteur*, IX, 1895, p. 199).

(4) Ficker, Ueber den Einfluss des Hungers auf die Bakteriendurchlässigkeit des Intestinaltraktus (*Arch. für Hygiene*, LIV, 1905, p. 335). — Ueber den Einfluss der Erschöpfung auf die Keimdurchlässigkeit des Intestinaltraktus (*Ibid.*, LVII, 1906, p. 56).

(5) Ikonnikoff, Passage des microbes à travers la paroi intestinale dans l'étranglement expérimental (*Ann. de l'Inst. Pasteur*, XXIII, 1909, p. 921).

(6) Charrin et Duclert, Des conditions qui règlent le passage des microbes au travers du placenta (*Soc. de Biol.*, 9 juin 1894).

toutefois une généralité absolue, est qu'elles ne récidivent pas, ou seulement après un certain laps de temps écoulé ; l'individu guéri est devenu plus ou moins *réfractaire* à de nouvelles infections par la même espèce. De plus, l'expérience a démontré que cet état réfractaire ou, comme on dit plus souvent, cette *immunité*, temporaire ou définitive, pouvait être acquise par de très légères atteintes de ces affections, telles que celles déterminées expérimentalement par l'inoculation de cultures *atténuées* dans leur virulence par l'un des agents qui l'affaiblissent et la font disparaître. En associant ces deux idées d'atténuation de la virulence des espèces et de non-récidive de l'affection, même après une attaque légère, on est arrivé à la méthode si féconde de la *vaccination*. C'est à Pasteur que revient l'honneur d'avoir fait entrer la vaccination dans le domaine scientifique et d'avoir indiqué les moyens rationnels qui conduisent l'observateur à créer des cultures atténuées, des *vaccins*. On connaît les belles applications de sa théorie au charbon, au choléra des poules, à la rage.

L'obtention de l'immunité, l'*immunisation*, peut être obtenue par l'intervention des seuls produits solubles fabriqués par le microbe, comme Charrin (1) l'a démontré le premier pour le *Bacille pyocyanique*, peu après lui, Roux et Chamberland (2) pour le *Vibrion septique* et le *Bacille du charbon symptomatique*. Bouchard (3) en a fait ressortir l'importance et les applications. Ces résultats ont été étendus depuis à bien d'autres espèces microbiennes, tout principalement le *Bacille du tétanos*, le *Bacille de la diphtérie*, le *Bacille typhique*, le *Colibacille*, le *Streptocoque pyogène*, le *Staphylocoque doré*, le *Pneumocoque*. On produit ainsi une véritable *vaccination chimique*.

Une telle immunité contractée à la suite d'une atteinte de maladie ou à la suite d'inoculation artificielle est dite *immunité acquise* ou *artificielle*. L'*immunité naturelle* est la propriété que possède naturellement un organisme de résister à une infection donnée. On ne sait encore que peu de choses au point de vue de l'immunité naturelle ; c'est surtout l'immunité acquise qui a été étudiée.

L'*immunité naturelle* peut être complète pour une infection donnée : l'animal y est absolument réfractaire ; ou seulement partielle : l'animal ne présente que des symptômes peu marqués, légers, à côté de ceux déterminés chez les animaux réceptifs.

Cette propriété peut être une propriété de classe, de genre, d'espèce, même seulement de race. Elle peut parfois aussi être individuelle, ne se rencontrer que chez quelques individus que rien ne peut faire distinguer de leurs voisins ; ici interviennent certainement les prédispositions individuelles que nous avons déjà vues faciliter ou entraver l'infection, ou des particularités héréditaires, et, dans ce cas, il y a alors souvent, sinon toujours, intervention des facteurs de l'immunité acquise. Nous trouverons, en étudiant les espèces pathogènes, de nombreux exemples de cette immunité naturelle de classes, de genres,

(1) Charrin, Sur les procédés capables d'augmenter la résistance de l'organisme à l'action des microbes (*C. R. de l'Acad. des sc.*, 24 octobre 1887).

(2) Roux et Chamberland, Immunité contre la septicémie conférée par des substances solubles (*Ann. de l'Inst. Pasteur*, I, 1887, p. 561).

(3) Bouchard, Thérapeutique des maladies infectieuses, 1888. — Les microbes pathogènes, 1892.

d'espèces ou de races. Elle peut tenir dans le premier cas à des différences capitales d'organisation. Ainsi la poule et la grenouille ont été considérées longtemps comme tout à fait réfractaires au charbon, si actif chez les Mammifères ; Pasteur a vaincu l'immunité de la première en abaissant sa température, Gibier celle de la seconde en l'élevant. Les différences peuvent être moins marquées, l'immunité n'est qu'incomplète ou apparente ; elle peut être vaincue par de fortes doses de virus, comme Chauveau l'a montré pour l'immunité relative des moutons barbarins à l'égard du charbon, ou par un virus d'activité très exaltée. Le hérisson possède à l'égard des toxines microbiennes, toxine diphtérique et toxine tétanique, et des toxines des venins de serpents, une immunité très marquée, immunité qui cède cependant à l'emploi de doses très fortes, qui n'est que *relative* (1).

L'immunité naturelle n'est pas, pour un organisme, une propriété générale à l'égard de toutes les infections, mais seulement à l'égard d'une ou plusieurs infections déterminées. Elle relève très probablement des mêmes facteurs que l'immunité acquise, facteurs qui semblent tous concourir au même but, l'exaltation des procédés de résistance de l'organisme ; pour Thiltges (2), l'immunité de la poule à l'égard du charbon serait due à la présence de substances bactéricides dans le sang. Les facteurs de l'immunité, en général, paraissent bien être ceux que nous avons vus concourir à la défense de l'organisme, phagocytose, production de substances bactéricides, antitoxiques, agglutinantes, etc.

C'est surtout l'*immunité acquise* qui nous intéresse. Elle peut même à la rigueur expliquer l'immunité naturelle qui n'est peut-être que la fixation héréditaire d'un caractère primitivement temporaire et acquis ; ce seraient deux manifestations du seul et même *état d'immunité*.

Bien des théories ont été émises pour expliquer l'immunité. Tout au début, Pasteur admettait que l'état réfractaire pouvait provenir de la consommation par le microbe de produits de l'organisme nécessaires à sa vie ; il se faisait un véritable épuisement du milieu relativement à ces principes, le milieu devenait impropre à la vie du microbe. Chauveau pensait, au contraire, que le microbe pouvait fabriquer dans l'économie des principes spéciaux, l'empêchant d'y continuer à vivre ; la persistance de ces principes expliquerait la durée de l'état d'immunité. L'obtention de l'immunité par l'introduction dans l'organisme des seuls produits solubles fabriqués par le microbe détruit ces théories ; à plus forte raison encore l'immunisation à l'égard de certains microbes, obtenue à l'aide de produits solubles sécrétés par des microbes bien différents. D'ailleurs, si les produits microbiens agissaient directement, comme le ferait une substance antiseptique, par exemple, l'immunité serait surtout marquée alors que l'organisme en contient une plus forte proportion. Or, d'ordinaire, c'est plutôt l'inverse que l'on remarque ; l'immunité met du temps à s'établir, elle ne croît que peu à peu pour atteindre son état maximum, alors que les produits microbiens intro-

(1) Strubell, Die Immunität des Igels gegen Toxine (*Centralbl. für Bakt.*, 1, Abth. Originale, LIII, 1909, p. 43).

(2) Thiltges, Beitrag zum Studium der Immunität des Huhnes und der Taube gegen den Bacillen des Milzbrandes (*Zeitschr. für Hygiene*, XXVIII, 1898, p. 189).

duits dans l'organisme tendent toujours à diminuer et à disparaître par suite de leur élimination par les divers émonctoires.

L'étude de l'immunité a suscité de nombreux travaux, au premier rang desquels doivent être mis ceux de Metschnikoff (1) et d'Ehrlich (2).

Il est possible de donner de l'immunité une explication rationnelle, en se basant sur ce qui a été dit précédemment des réactions de défense de l'organisme. Elle est à considérer comme le résultat de la phagocytose et des modifications humorales qui se produisent dans l'organisme à la suite de l'action des microbes ou de leurs produits. Ces phénomènes peuvent se manifester à la suite de l'introduction des seuls produits microbiens formés en dehors, dans des milieux purement artificiels. Lorsque le microbe intervient, il fabrique sur place, aux dépens de l'organisme, les produits actifs; en dernière analyse, on trouve donc comme véritables facteurs ces produits qui, par diffusion, vont agir sur les éléments voulus.

Sous l'influence du microbe lui-même ou des produits microbiens introduits, la phagocytose est augmentée, souvent dans de fortes proportions, à la suite des actions de chimiotaxie positive déterminant l'afflux des leucocytes, de l'effet des opsonines et bactériotropines stimulant leur activité. Le rôle et l'importance des globules blancs dans l'immunité sont bien démontrés. Pettersson (3) a observé qu'en introduisant dans l'organisme des globules blancs provenant d'animaux vaccinés, ces éléments protégeaient réellement contre des doses plusieurs fois mortelles de microbes infectieux, alors que des leucocytes d'organismes dépourvus d'immunité ne donnaient aucun résultat. Salimbeni (4) a montré que de tels globules blancs pouvaient même assurer l'immunité après des lavages successifs et gardaient cette propriété quand les humeurs avaient tout à fait perdu leur pouvoir protecteur, ce qui prouve la prépondérance de l'action cellulaire, de la phagocytose, sur l'action humorale.

Le sérum des individus immunisés jouit de propriétés destructives énergiques à l'égard des microbes; le *phénomène de Pfeiffer* (p. 133) en est une preuve très nette, c'est réellement une réaction d'immunité et pas une réaction d'infection. L'introduction des antigènes spéciaux, microbes et produits microbiens, détermine la production des anticorps spécifiques qui occasionnent les effets voulus, les substances à effets bactériolytiques, alexine et sensibilisatrices, les agglutinines, les précipitines et surtout les antitoxines.

Comme le dit avec tant d'autorité Metschnikoff, « l'ensemble des phénomènes que l'on observe dans l'immunité se réduit donc à une série d'actes biologiques, tels que la sensibilité des phagocytes, leurs mouve-

(1) Metschnikoff, L'immunité dans les maladies infectieuses. Paris, 1901. — Sur l'état actuel de la question de l'immunité dans les maladies infectieuses. Conférence Nobel faite à Stockholm le 14 mai 1909 (*Bull. de l'Inst. Pasteur*, VII, 1909, p. 545 et 593).

(2) Ehrlich, Die Werthbestimmung des Diphterieheilserums und ihre theoretische Grundlagen. Iena, 1897. — Die Konstitution des Diphteriegiftes (*Deutsche med. Wochenschr.*, 1898).

(3) Pettersson, Die Rolle der Leukocyten im Kampfe des Tierorganismus gegen die Infektion (*Centralbl. für Bakt.*, 1, Abth., Originale, XLII, p. 56).

(4) Salimbeni, Les modifications des globules blancs dans l'immunité acquise (*Ann. de l'Inst. Pasteur*, XXIII, 1909, p. 558).

ments actifs dirigés vers les endroits menacés par les microbes, et à une série d'actes chimiques et physiques qui amènent la destruction et la digestion des agents infectieux ».

D'après l'importance que l'on doit attribuer aux leucocytes dans toutes ces diverses réactions, ces éléments doivent être vraisemblablement regardés comme les véritables facteurs de l'immunité.

L'incitation ainsi provoquée dans l'organisme peut être passagère ou persistante, selon que les éléments actifs perdent au bout de quelque temps la propriété de réagir dans le sens spécial ou la gardent plus ou moins longtemps, même en l'absence d'excitation nouvelle produite par la présence constante des produits microbiens, continuant par une sorte d'habitude la réaction biologique, la fonction provoquée chez eux à un moment donné.

Pour d'autres, l'action se réduirait à des actions physiques ou physico-chimiques entre colloïdes, les uns provenant des microbes, les autres de l'organisme (1).

D'après ce qui a été dit, on voit que l'immunisation peut être obtenue de deux manières bien différentes. Ou bien l'organisme, sous les influences voulues, produit, par son activité propre, les réactions nécessaires à l'établissement du phénomène : c'est l'*immunité active*. Ou bien la substance immunisante, l'antitoxine, préformée, peut être introduite, en quantité suffisante, dans l'organisme qui joue alors un rôle purement passif, n'est que le terrain où se passe la réaction : c'est l'*immunité passive*.

On a vu précédemment que les toxines microbiennes introduites dans l'organisme y provoquaient la production d'anticorps spécifiques, les *antitoxines*, et que l'existence de ces antitoxines était facile à démontrer, principalement dans le sang. Au bout d'un certain temps, elles y sont produites en quantité suffisante pour déterminer l'immunisation du sujet. Il est possible de faire plus. En assurant la continuation des effets de la toxine par des apports nouveaux, on peut observer la production de quantités toujours croissantes d'antitoxine correspondante et son accumulation dans le sang. Le sang peut alors s'enrichir en antitoxine à un point tel qu'une quantité relativement minime de ce liquide, quelques centimètres cubes par exemple, suffit même pour créer, chez un autre organisme auquel on l'inocule, une immunité passive à l'égard de la toxine employée ou du microbe qui la produit, et dès lors empêcher l'action microbienne ou neutraliser les toxines introduites postérieurement ou même formées antérieurement dans cet organisme. Bouchard a montré que le sérum avait, à ce point de vue, les mêmes qualités que le sang complet, et était plus facile à employer. C'est là le principe de la *sérothérapie*.

Le sérum des animaux réfractaires à une infection donnée, doués de l'immunité naturelle, peut aussi servir dans le même sens ; mais la quantité de principes actifs, sous un faible volume, est trop peu considérable pour que l'on puisse généralement obtenir des effets suffisants.

C'est à Richet et Héricourt (2) que revient le mérite d'avoir, les pre-

(1) V. Henri, État actuel de nos connaissances sur le mécanisme de l'immunité (*Sem. méd.*, 4 septembre 1907).

(2) Richet et Héricourt, Sur un microbe pyogène et septique et sur la vaccination contre ses effets (*Soc. de Biol.*, 1888, et *C. R. de l'Acad. des sc.*, CVII, 1888, p. 690).

miers, indiqué cette voie nouvelle. Ils ont montré, en 1888, qu'en inoculant au chien, à doses progressivement croissantes, des cultures de *Micrococcus pyosepticus*, on lui conférait rapidement une immunité complète à l'égard de ce microbe. En injectant alors du sang d'un tel chien immunisé dans le péritoine de lapins, on immunisait ces derniers à leur tour ; ils résistaient très bien à l'infection par le microbe qui occasionne rapidement la mort chez le lapin neuf.

Charrin (1), en 1889, note la production d'une immunité incomplète à l'égard de l'infection pyocyanique chez le lapin auquel on a préalablement inoculé du sang de lapin vacciné à l'aide des produits solubles du *Bacille pyocyanique*.

Behring et Kitasato (2) ont vraiment fait entrer la question dans la pratique. Après avoir obtenu l'immunité d'animaux contre le tétanos et la diphtérie à l'aide d'inoculations répétées des toxines, ils ont montré que le sérum d'un animal, fortement immunisé à l'égard de l'une de ces infections, détruisait *in vitro* de grandes quantités de la toxine correspondante et agissait de même dans l'organisme animal; qu'en outre, chez un animal neuf, il protégeait contre l'inoculation du microbe spécial ou des toxines formées par lui. C'est la base des indications sérothérapiques actuelles.

Ces résultats ont été bien des fois confirmés et étendus à d'autres types microbiens. On en connaît aujourd'hui toute une série qui s'y prêtent, plus ou moins bien cependant ; pour d'autres, les résultats sont nuls ou insuffisants. Des détails circonstanciés sur la manière de faire et sur les résultats obtenus seront donnés à propos de l'étude particulière de ces différents microbes.

Les sérums agissant par la présence d'une antitoxine spécifique sont dits *sérums antitoxiques*. Ils peuvent être *préventifs*, s'opposant à une infection par le microbe lui-même, ou *curatifs*, annihilant les effets des toxines déjà produites par l'infection, quand toutefois les lésions produites par la toxine ne sont pas trop profondes, établies, ou que l'antitoxine peut suffisamment diffuser pour aller chercher la toxine où elle s'est localisée et rompre sa fixation sur les éléments cellulaires qui ont pour elle une affinité particulière, comme celle des éléments nerveux pour la toxine tétanique.

D'autres sérums agissent par leurs propriétés bactéricides ; ils contiennent peu ou pas d'antitoxine, parce que les procédés mis en œuvre, surtout l'emploi de produits microbiens peu riches en toxine, n'en permettent pas une production notable, mais sont riches en alexine et surtout en sensibilisatrices spécifiques, en ambocepteurs, qui font que l'alexine agit très énergiquement sur le microbe déterminé, riches également en opsonines et bactériotropines qui facilitent aussi la destruction. Ces sérums sont dits *bactéricides* ou *antimicrobiens*. Ils ne peuvent être que *préventifs* à l'égard de l'infection microbienne ; ils n'agissent que sur les microbes vivants et pas sur des toxines déjà produites. Leur puissance curative est nulle ou très peu marquée et insuffisante, puisqu'ils ne renferment que très peu d'antitoxine.

En combinant l'action des sérums immunisants et des cultures actives

(1) Charrin, La maladie pyocyanique, 1889, p. 88.

(2) Behring et Kitasato, Ueber das Zustandekommen der Diphterie-Immunität und der Tetanus-Immunität bei Tieren (*Deutsche med. Wochenschr.*, 1890).

ou des toxines, on arrive à obtenir une immunisation plus rapide ; on greffe l'immunité active sur l'immunité passive ; il est, dans ce cas, possible d'intervenir de suite avec de fortes doses de produits actifs que l'organisme supporte beaucoup plus facilement grâce à l'état d'immunité passive déterminée par le sérum. Bezredka (1) dit avoir obtenu de bons résultats par l'usage d'un vaccin spécial obtenu en faisant d'abord agir le sérum spécifique sur le microbe, puis en inoculant ensuite les microbes après les avoir débarrassés du sérum par des lavages répétés et les avoir tués par le chauffage à 58°-60° pratiqué soit avant leur addition au sérum (*Bacille pesteux*), soit après l'élimination du sérum en excès par des lavages à l'eau stérilisée (*Spirille du choléra*, *Bacille typhique*). La quantité de substance active du sérum introduite est exactement celle qui peut être fixée par les corps microbiens ; elle est justement suffisante pour permettre à l'organisme de résister par immunité passive et d'attendre le développement de l'immunité active. Un excès serait défavorable en retardant ou empêchant la production de cette dernière réaction.

On peut obtenir les mêmes effets d'immunité passive, variables d'intensité, en usant d'autres humeurs pouvant contenir de l'antitoxine, comme il a été vu page 144. Bouchard (2) l'a observé dès 1889 pour l'urine dans l'infection pyocyanique ; Ehrlich et Wassermann (3) pour le lait de femelles immunisées contre la diphtérie.

La persistance de cet état d'immunité qu'acquiert un organisme à la suite d'une atteinte d'infection ou à la suite d'une pénétration de toxines est des plus variable. Elle peut être de longue durée ou, au contraire, cesser assez rapidement dès que l'incitation nécessaire à la mise en œuvre des moyens de résistance, particulièrement à une production suffisante d'antitoxine, est supprimée. On ne peut encore actuellement tracer de règles générales à ce sujet. L'observation tend à démontrer que la vaccination jennérienne confère à l'homme, à l'égard de la variole, une immunité d'environ dix ans. Dans les expériences de laboratoire, faites avec différents virus, il n'a pas encore été possible d'arriver à préciser de durée ; il semble, cependant, que l'immunité obtenue par les produits solubles seuls soit généralement d'une persistance moins longue que celle obtenue par l'infection par le microbe lui-même. Quant à l'immunité passive, obtenue au moyen d'antitoxine, elle est en général peu durable ; l'antitoxine, introduite dans le sang, se détruit graduellement sans que l'on puisse compter sur une production nouvelle d'antitoxine par l'organisme suffisante pour avoir des effets quelque peu durables.

La longue durée que présente parfois l'état d'immunité est un indice évident de la profonde imprégnation de l'organisme qui met en œuvre les procédés de résistance.

D'après les détails qui précèdent et surtout la production de l'immu-

(1) Bezredka, De la vaccination active contre la peste, le choléra et l'infection typhique (*C. R. de l'Acad. des sc.*, 9 juin 1902).

(2) Bouchard, Thérapeutique des maladies infectieuses, 1887, p. 140.

(3) Ehrlich et Wassermann, Ueber die Gewinnung der Diphterie-Antitoxin aus Blutserum und Milch immunisirter Thiere (*Zeitschr. für Hygiene*, XVIII, 1894, p. 239). — Wassermann, Ueber Concentrirung der Diphterie-Antitoxin aus der Milch immunisirter Thiere (*Ibid.*, XVIII, 1894, p. 235).

nité par la seule action de produits solubles, il n'y a pas lieu de s'étonner des nombreux exemples qui démontrent la transmission de l'état d'immunité par la mère aux produits qu'elle engendre. On a depuis longtemps constaté, par exemple, que l'enfant né d'une mère varioleuse, naissant sans trace de l'éruption caractéristique, se montrait réfractaire au virus de la variole ou de la vaccine; de même que l'enfant mis au monde par une femme vaccinée au cours de la grossesse se montre souvent réfractaire à l'inoculation de la vaccine. Chauveau, Arloing, Cornevin et Thomas, Kitasato, ont rapporté de nombreux faits d'immunité d'agneaux nés de brebis vaccinées pendant la gestation contre le charbon ou le charbon symptomatique. On a même observé des faits indéniables d'immunité chez les produits nés d'une mère vaccinée à une époque antérieure à la gestation. Pour les immunisations qui se produisent par l'action d'antitoxines, on comprend aisément qu'il peut y avoir passage direct d'antitoxine maternelle dans le sang du fœtus, le placenta pouvant ne pas toujours s'opposer au passage de telles substances solubles, mais difficilement dialysables, ou bien production directe d'antitoxine par les éléments cellulaires du fœtus sous l'influence de l'incitation de ces éléments produite par l'antitoxine maternelle. Pour les immunités qui ne paraissent pas provenir de l'existence d'antitoxine, ce peut être par une transmission d'une propriété spéciale des éléments phagocytaires ou le passage de substances excitantes pour la phagocytose que s'expliquerait cette hérédité. Les recherches d'Ehrlich (1) et de Vaillard (2) démontrent nettement que c'est la mère seule qui est apte à transmettre cette hérédité à ses descendants; l'action du père serait nulle, contrairement à quelques observations de Charrin et Gley (3); ceci se conçoit facilement d'après ce que l'on sait. L'immunité transmise par la mère est toujours de courte durée; elle s'épuise après quelques mois.

Cette question de la transmission héréditaire de l'état d'immunité nous conduit à parler de l'action des microbes pathogènes ou des substances qu'ils fabriquent sur les produits de la génération.

A l'état normal, le placenta de la mère forme une barrière sûre contre la pénétration dans le sang du fœtus d'agents figurés contenus dans le sang de la mère. Il n'en est plus de même pour les produits solubles que le sang maternel peut contenir; il s'établit forcément un échange, peut-être même un équilibre de diffusion, entre les deux sangs. De plus, il est amplement démontré (4) que le placenta altéré, même d'une façon très minime, peut très bien laisser passer des microbes pathogènes, et les altérations du placenta sont communes dans les infections.

L'influence du père est ici beaucoup plus douteuse; on verra que, pour la tuberculose, les expériences de Gaertner (5) tendent à la faire

(1) Ehrlich, Ueber Immunität durch Vererbung und Saügung (*Zeitschr. für Hygiene*, XII, 1892).

(2) Vaillard, Sur l'hérédité de l'immunité acquise (*Ann. de l'Inst. Pasteur*, X, 1896, n° 2).

(3) Charrin et Gley, *Soc. de Biol.*, 1894, 1895, 1896.

(4) Sanchez-Toledo, Recherches expérimentales sur la transmission de la tuberculose de la mère au fœtus (*Arch. de méd. expér.*, 1889, p. 511). — Charrin et Duclert, Passage des microbes à travers le placenta (*Soc. de Biol.*, 1894, p. 476).

(5) Gaertner, Ueber die Erblichkeit der Tuberkulose (*Zeitschr. für Hygiene*, XIII, 1893, p. 101).

considérer comme nulle, ce qu'ont confirmé les expériences de Friedmann (1) et de Seige (2). La transmission de l'infection ou de certaines de ses conséquences devrait ici se faire par le sperme, ou plutôt par le spermatozoïde au moment de la fécondation. On a bien signalé la présence dans le sperme de microbes pathogènes, du *Bacille de la tuberculose* entre autres, mais quel peut être le sort de tels microbes? Il serait bien téméraire de l'affirmer.

C'est donc surtout de l'action maternelle qu'il y a lieu de tenir compte ici.

La transmission directe de microbes pathogènes de la mère au fœtus, qui s'observe lorsque le placenta est altéré, détermine généralement des effets et des lésions qui rappellent ce que l'on observe dans l'infection directe de l'organisme. Il n'en est plus de même quand les produits solubles interviennent seuls; il se produit souvent bien des effets qui diffèrent, parfois même considérablement, des effets ordinaires de l'infection et dont certains peuvent jeter une précieuse lumière sur l'histoire encore si obscure de l'hérédité.

Les recherches de Charrin et Gley (3) sur le lapin et le cobaye, de Féré (4) sur l'embryon de poulet, démontrent qu'en faisant agir des toxines sur la mère pour les mammifères ou sur l'œuf pour les oiseaux, il est possible de créer chez les produits des désordres importants, de produire des difformités variées, le nanisme, l'infantilisme, voire même des modifications tératologiques profondes, et prouvent que dans cette question de *transmission héréditaire* ce sont surtout les produits solubles toxiques qui doivent entrer en ligne de compte (5); leur influence est bien souvent à substituer à la transmission microbienne directe. D'après Maffucci (6), le poison tuberculeux, amené par le sperme de mâles tuberculeux, serait, chez le lapin, une cause puissante de la mortalité précoce des nouveau-nés. C'est une question d'un très haut intérêt pour le biologiste et spécialement pour le médecin.

Parmi les êtres vivants, les animaux ne sont pas les seuls à être en but aux attaques de microbes nocifs; les plantes de tous les groupes ont, tout aussi bien qu'eux, des parasites du même ordre. On connaît déjà un assez grand nombre de maladies de plantes dues à de véritables microbes pathogènes pour elles.

Il est encore difficile de se faire actuellement une idée générale sur le mode d'action de tels agents pathogènes. Les effets qu'ils produisent sont variés (7). Ce peut être une hyperplasie causée vraisemblablement

(1) Friedmann, Experimentelle Studien über die Erblichkeit der Tuberkulose (*Zeitschr. für klin. Med.*, XLII, 1901, p. 11).

(2) Seige, Zur Uebertragung des Tuberkelbazillen durch denväterlichen Samen auf die Frucht (*Arb. aus dem Kaiserl. Gesundheitsamte*, XX, 1904, p. 139).

(3) Charrin et Gley, Influence de l'infection sur les produits de la génération (*Soc. de Biol.*, 1881, p. 809). — Id., Influences héréditaires (*C. R. de l'Acad. des sc.*, CXVII, 1894, p. 635). — Charrin, Influence des toxines sur la descendance (*Arch. de physiol.*, 1895, p. 798). — Id, Rachitisme expérimental (*Soc. de Biol.*, 18 avril 1896).

(4) Féré, Influence des toxines microbiennes sur l'évolution de l'embryon (*Soc. de Biol.*, 5 mai 1894).

(5) Charrin, Le rôle des substances solubles dans la transmission des tares pathologiques des ascendants (*Semaine médicale*, 17 décembre 1902).

(6) Maffucci, *Rivista di clin. med.*, 15 et 22 février 1902.

(7) Vuillemin, Considérations générales sur les maladies des végétaux (*Traité de path. gén.* de Bouchard, t. I).

par l'excitation anormale due à la présence du parasite, d'où formation de tumeurs comme dans la tuberculose bacillaire de l'olivier (1) ou dans la bactériocécidie du pin d'Alep (2). Ou bien ce sont des phénomènes de nécrose, de pourriture, causés probablement par l'action de sécrétions toxiques ou diastasiques produites par le microbe. De plus amples détails seront donnés plus loin à l'article *Bacilles des maladies des plantes.*

BACTÉRIES CHROMOGÈNES

Nous avons vu précédemment (p. 30) que les cellules peuvent former des matières colorantes bien diverses. Ces pigments sont produits par le protoplasma cellulaire. La coloration d'un élément isolé est très faible et difficile à apercevoir ; il ne se produit de nuance sensible à l'œil que lorsque les éléments forment des amas. La plupart du temps, le pigment ne diffuse jamais dans le milieu ambiant pendant la vie de la cellule, mais seulement après sa mort, et peut-être aussi dans ces sortes de dégénérescences désignées sous le nom de *formes d'involution.* Dans quelques espèces, au contraire, la matière colorante se répand plus ou moins loin dans le substratum, auquel elle donne alors un aspect spécial. C'est ainsi que les gelées nutritives où se développent les *Bacillus fluorescens*, le *Bacille pyocyanique*, prennent rapidement par diffusion une teinte verdâtre, que n'offre même pas la colonie superficielle. Il est des espèces, le *Bacillus lactis erythrogenes*, par exemple, qui ne forment de pigment que dans leurs spores.

La nuance varie considérablement suivant l'espèce (3). Les *Sarcina lutea*, *Micrococcus luteus*, *Micrococcus cereus flavus* donnent des colonies d'un beau jaune-citron ; les *Bacillus luteus*, *Micrococcus pyogenes aureus*, des Zooglées d'un jaune d'or ; de nombreuses *Bactéries rouges* (4) donnent du rouge plus ou moins vif ; le *Micrococcus prodigiosus*, du rouge rose ; le *Beggiatoa roseapersicina*, du rose plus violet : le *Micrococcus cinnabareus*, du rouge-cinabre ; le *Micrococcus roseus*, du rose-chair. D'autres fois, les conditions de vie déterminent d'importantes variations de nuances.

Le *Bacillus syncyanus* du lait bleu produit du bleu de ciel ou du bleu grisâtre ; le *Bacillus pyocyaneus* du pus bleu, du bleu vert.

Les *Bacilles violets* possèdent un pigment violet noir ou violet tendre.

La couleur brune ou brun noir a été signalée chez le *Bacillus brunneus* par Schroter (5), par Macé chez certains *Cladothrix* (6). Elle s'observe aussi chez le *Bacille du lait noir* de Gorini, le *Bacillus mesentericus niger* de Biehl, parfois chez le *Bacille pyocyanique* (7).

(1) Prillieux, *C. R. de l'Acad. des sc.*, CVIII, 1889, p. 249.

(2) Vuillemin, Sur une bactériocécidie ou tumeur bacillaire du pin d'Alep (*C. R. de l'Acad. des sc.*, 26 novembre 1888).

(3) Schneider, Die Bedeutung der Bakterienfarbstoffe für die Unterscheidung der Arten (*Arb. aus dem bakt., Inst. der grossh. Hochschule zu Karlsruhe,* 1895).

(4) Molisch, Die Purpurabakterien. Iena, Fischer, 1907.

(5) Schroter, Ueber einige durch Bacterien gebildete Pigmente (*Cohn's Beitr. zur Biol. der Pflanzen*, 12e, p. 109, 1881).

(6) Macé, Sur les caractères de cultures du *Cladothrix dichotoma* (*C. R. de l'Acad des sc.*, 1888).

(7) Guignard et Sauvageau, Sur un nouveau microbe chromogène, le *Bacillus chlororaphis* (*Soc. de Biol.*, 22 décembre 1894).

Le *Bacille de la diarrhée verte des nourrissons* colore en vert plus ou moins foncé les substrats solides sur lesquels on le cultive. On est moins fixé sur la coloration verte des *Bacillus viridis* et *Bacillus virens* de Van Tieghem (1) et sur le *Bacillus chlorinus* d'Engelmann (2), que ces auteurs regardent, sans preuves à l'appui et à tort très probablement, comme colorés par de la chlorophylle. Le *Bacillus chlororaphis* (3) produit dans les bouillons et la gélatine des houppettes cristallines d'un beau vert.

La présence d'une matière colorante à fluorescence verte a été signalée chez un assez grand nombre d'espèces (4). Flügge l'a indiquée chez les *Bacillus fluorescens liquefaciens* et *Bacillus fluorescens putridus* ; Gessard (5) chez le *Bacille pyocyanique* avec la pyocyanine, chez le *Bacille du lait bleu* accompagnant aussi le pigment spécial ; Lepierre (6), Ducamp et Planchon (7) chez d'autres Bactéries de l'eau qui semblent bien distinctes des premières. Cette propriété de produire un tel pigment, cette *fonction fluorescigène*, comme on a dit, est complètement distincte de la *fonction chromogène* proprement dite. Chez le *Bacillus chlororaphis*, par exemple, les cultures qui donnent beaucoup de pigment, en petits cristaux verts, présentent une fluorescence très faible ou nulle ; inversement, les cultures très fluorescentes donnent de très rares cristaux, ou même pas du tout. Il y aurait donc plutôt antagonisme de ces deux fonctions. Du reste, la fluorescence et le pigment ne sont pas sous les mêmes influences dominantes ; ce qui favorise nettement l'un reste complètement sans effet sur l'autre. Toutefois, la fluorescence n'est pas ici un simple phénomène physique ; elle est bien due à un corps chimique, tout comme dans la formation de pigment. Il est prouvé qu'il est des Bactéries pouvant produire à la fois plusieurs pigments ; le fait ne doit, du reste, pas plus étonner que la production simultanée par beaucoup d'Algues de pigment vert et de pigment rose ou bleuâtre. Une intéressante espèce que j'ai isolée d'une eau de puits et que G. Thiry a étudiée dans mon laboratoire, le *Bacille polychrome*, peut donner, suivant les conditions, du vert, du jaune, du bleu, du rose ou du violet, à peu près la gamme complète des couleurs du spectre (8) ; toutefois, sauf pour le jaune, les différentes colorations semblent être dues à une seule et même substance diversement influencée. Charrin et de Nittis (9)

(1) Van Tieghem, Observations sur les Bactériacées vertes (*Bull. de la Soc. Bot.*, 1880, p. 174).

(2) Engelmann, Zur Biologie der Schizomyceten (*Bot. Zeit.*, 1882).

(3) Radais, *Soc. de Biol.*, 31 juillet 1898.

(4) Thum, Beiträge zur Biologie der fluorescierenden Bakterien (*Arb. aus den bakt., Inst. der grossh. Hochschule zu Karlsruhe*, 1895).

(5) Gessard, Nouvelles recherches sur le Bacille pyocyanique (*Ann. de l'Inst. Pasteur*, IV, 1890). — Fonctions et races du Bacille cyanogène (*Ibid.*, V, 1891).

(6) Lepierre, Recherches sur la fonction fluorescigène des microbes (*Ann. de l'Inst. Pasteur*, IX, 1895).

(7) Ducamp et Planchon, Note sur un Bacille fluorescent et liquéfiant des eaux d'alimentation de Montpellier (*Soc. de Biol.*, 17 mars 1894).

(8) G. Thiry, Sur une Bactérie produisant plusieurs couleurs (*B. polychrome*) (*Soc. de Biol.*, 7 novembre 1896). — Id., Contribution à l'étude du polychromisme bactérien (Bacille et Cladothrix polychromes) (*Arch. de physiol.*, avril 1897). — Id., Bacille polychrome et Actinomyces mordoré. Thèse de Nancy, 1900. Paris, J.-B. Baillière. — Chamot et Thiry, Studies on chromogenic bacteria. I. Notes on the pigment of Bacillus polychromogenes (*Botan. Gaz.*, 1900, p. 378).

(9) Charrin et de Nittis, Sur la production simultanée des pigments noir, bleu, vert et jaune, par un Bacille pyocyanique (*Soc. de Biol.*, 2 juillet 1898).

ont observé chez le *Bacille pyocyanique* la production simultanée des pigments noir, bleu, vert et jaune. Des Bactéries différentes, par contre, peuvent produire un pigment identique.

La nature de ces pigments est très peu connue. Quelques-uns seulement sont solubles dans l'eau ; la plupart y sont insolubles et solubles dans l'alcool absolu, l'acétone, l'éther ou le chloroforme ; d'autres, insolubles dans ces réactifs, demandent l'emploi de procédés spéciaux pour être isolés. L'isolement des pigments est rendu très difficile par les oxydations ou les réductions qui se passent pendant les manipulations.

La composition de ces produits ne sera bien connue que lorsqu'on pourra les obtenir à l'état cristallisé ; alors seulement on pourra en faire l'analyse élémentaire. Jusqu'ici on n'a obtenu à l'état plus ou moins pur que la pyocyanine, le pigment du *Cladothrix mordoré* et la *chlororaphine* du *Bacillus chlororaphis* (1).

Certains de ces pigments paraissent devoir être rangés dans la classe des pigments végétaux qui ont reçu le nom de *lipochromes*. Le type en est la *carottine*, matière colorante jaune de la carotte ; d'autres abondent dans les Champignons, *Peziza aurantiaca*, *Spatularia flavida*, *Leotia lubrica*, *Calocera viscosa*, par exemple. Le nom qui leur a été donné provient de ce qu'ils semblent combinés à des corps gras et peuvent se présenter au microscope sous forme de gouttelettes oléagineuses. Leurs nuances sont le jaune, le rouge, le jaune vert et l'orangé. On les appelle aussi *lutéines*, à cause de cette prédominance de jaune.

Les lipochromes sont solubles dans l'éther, l'acétone, l'alcool éthylique et méthylique, la benzine, l'essence de térébenthine, le chloroforme, le sulfure de carbone, l'essence de pétrole. Elles sont saponifiables à chaud par la lessive de soude. Traitées à l'état sec par l'acide sulfurique ou l'acide azotique concentrés, elles prennent une coloration vert pâle, bleu vert ou bleu sombre (réaction de la *lipocyanine*). Au spectroscope, elles donnent deux bandes d'absorption, l'une vers F, l'autre entre F et G.

Les lipochromes rouges sont nommées *liporhodines* ; les jaunes, *lipoxanthines*.

D'autres se rapprochent certainement plus des alcaloïdes ; la chlororaphine, la pyocyanine présentent à peu près toutes les réactions des alcaloïdes. Comme ce sont les seuls pigments que l'on ait pu obtenir cristallisés, conséquemment purs, il semble que ce soit la considération qui doive primer.

Les conditions de milieu ont une influence très variable sur la production de ces pigments.

La lumière ne semble pas du tout nécessaire à la production du pigment. Des cultures de *Micrococcus prodigiosus* et de *Bacillus violaceus*, faites à l'obscurité et conservées à la chambre noire, se sont montrées, après quelques semaines, tout aussi colorées que d'autres, faites en même temps, au grand jour. Le *Micrococcus ochroleucus* donnerait des cultures incolores à l'obscurité.

L'oxygène paraît nécessaire ; lorsque l'espèce se développe dans un milieu confiné, elle se colore mal ; quand l'air fait presque complète-

(1) Lasseur, Le *Bacillus chlororaphis* et la chlororaphine (*Soc. de Biol.*, 1909, LXVI, p. 272).

ment défaut, elle ne se colore pas du tout. Les Bactéries à couleurs vives que l'on fait se développer sous une petite couche d'huile donnent des colonies blanches, qui peuvent se teindre, si la couche préservatrice vient à être enlevée. L'oxygène pur serait nuisible ; c'est du moins ce que prouvent les expériences de Charrin et Roger (1) sur le *Bacillus pyocyaneus*. Les *Spirillum rubrum* et *Spirillum nigrum* produisent leur pigment en vie anaérobie.

La composition du milieu exerce une influence capitale sur la production et la nature de la matière colorante. Gessard (2) a observé que, pour le *Bacille pyocyanique*, la production de la fluorescence est étroitement liée à la présence de phosphates dans le milieu ; Lepierre, dans son travail précédemment cité, n'a observé aucune influence des phosphates. La production de pigment noir par le *Bacille pyocyanique* serait étroitement liée à la présence de tyrosine dans le milieu.

La réaction du milieu influe souvent beaucoup sur la nuance du pigment. C'est une simple réaction chimique analogue à celle que présentent bien des couleurs végétales, le tournesol en particulier. Ainsi, le pigment que produit le *Bacille du lait bleu* dans un milieu neutre est gris ardoisé; sa nuance passe au bleu de ciel dans les milieux acides et devient rougeâtre en milieu alcalin. Comme bien des espèces modifient souvent du tout au tout la réaction des milieux où on les fait vivre, au fur et à mesure que la culture avance en âge, il arrive qu'on peut observer des successions de nuances diverses, bien qu'il ne soit question que d'une seule et même matière colorante ; la nuance que l'on observe au début dans un milieu alcalin change si la Bactérie produit un acide qui, petit à petit, neutralise l'alcali et finit par donner au milieu une réaction nettement acide.

La pyocyanine se conserve sans altération en solution acide, rouge ; elle se décompose, au contraire, rapidement en solution alcaline, bleue ; ce sont de simples questions de facilité d'oxydation.

Toutes les conditions qui diminuent l'activité du développement, qui *atténuent* la vitalité d'une espèce, font aussi décroître sa puissance chromogène. Des cultures successives de plusieurs générations sont rarement aussi colorées que les premières ; elles deviennent même souvent tout à fait incolores. Le *Micrococcus prodigiosus* est souvent blanc rosé dans ces conditions ; le *Bacillus violaceus*, d'un si beau violet noir, devient souvent entièrement blanc dès la troisième ou quatrième culture. C'est une question de dégénérescence. En faisant une sélection très raisonnée, avec des milieux très appropriés, on arrive au contraire à obtenir une production de pigment plus intense.

Les produits chimiques nuisibles, les antiseptiques agissent de même et entravent la production du pigment lorsqu'ils sont ajoutés en quantité assez minime pour ne pas tuer la Bactérie. Charrin et Roger ont démontré qu'on pouvait graduer la production de la pyocyanine par le *Bacillus pyocyaneus*, en ajoutant aux cultures des proportions de plus en plus fortes de sublimé corrosif. Tandis qu'avec des proportions de $0^{gr},015$ à $0^{gr},02$ de sublimé par litre on ne fait que retarder l'apparition

(1) Charrin et Roger, Des modifications qu'on peut provoquer dans les fonctions d'un microbe chromogène (*Soc. de Biol.*, 4 novembre 1887).

(2) Gessard, Sur la fonction fluorescigène des microbes (*Ann. de l'Inst. Pasteur*, VI, 1892, p. 801).

de la matière colorante, on l'arrête bientôt en augmentant progressivement la dose.

La chaleur paraît être, en général, une condition défavorable à la production du pigment ; peu d'espèces donnent leur pigment à l'étuve vers 35°, ou n'en produisent que très peu. Le *Bacillus indicus* et le *Bacillus mesentericus niger* sont de celles qui donnent bien leur pigment à l'étuve.

Une de ces espèces à puissance chromogène atténuée, presque disparue, peut cependant, sous des influences de cultures, récupérer la propriété de donner du pigment, tout comme le font des espèces pathogènes pour leur virulence : en faisant passer plusieurs fois sur pomme de terre le *Bacillus violaceus*, il est possible de voir reparaître son pouvoir chromogène, en partie au moins.

La nature du milieu joue un grand rôle, qui n'est malheureusement encore guère défini. Il est des espèces, le *Bacillus violaceus* par exemple, qui, cultivées dans des liquides, ne forment que des traces de pigments, alors qu'elles en produisent des quantités considérables sur les milieux solides. Le *Bacille du lait bleu* colore le lait en bleu foncé ; cultivé sur gélatine ou sur gélose, il colore ces gelées en vert d'abord, puis en brun foncé et la colonie reste blanche. Pour donner des cultures colorées, les *Bacilles fluorescents*, d'après Jirou (1), ont besoin de carbone organique (glucose, glycérine), la source d'azote pouvant alors être minérale ; pour que le *Bacille pyocyanique* produise de la pyocyanine, il faut que l'élément azoté soit de nature organique et la source de carbone organique, sauf cependant pour les composés ammoniacaux, qui permettent à eux seuls la formation du pigment. Les phosphates paraissent indispensables à la fonction fluorescigène. Beaucoup de pigments rouges et des pigments violets exigent la présence du sulfate de magnésie et d'un phosphate. Le pigment noir du *Bacillus cyaneo-fluorescens* ne se formerait qu'en présence d'acide lactique. Pour le *Bacillus chlororaphis*, le fer est absolument indispensable pour la production du pigment vert (Lasseur). Pour beaucoup de pigments, il y aurait un élément indispensable, variable avec les espèces. L'emploi de milieux synthétiques, de composition absolument connue et précisée, permet au mieux de se rendre compte de ces influences (2).

L'âge des cellules influe sur la nuance du pigment : des éléments âgés se décolorent en partie ou leur nuance change. Les cellules mortes paraissent souvent concentrer le pigment qui diffuse dans le milieu ; le fait se remarque très bien sur le *Micrococcus prodigiosus*. Il en est probablement de même pour les autres protoplasmas vivants. C'est ainsi que doivent s'expliquer les phénomènes décrits par Matruchot (3), qui a vu le protoplasma d'éléments immergés d'une Moisissure du genre *Mortierella*, cultivée avec un *Bacille violet*, s'imprégner de matière colorante violette ; de tels éléments immergés des Moisissures sont souvent morts ou à vie très ralentie. Des phénomènes semblables ont,

(1) Jirou, Sur les Bacilles fluorescents et le pyocyanique (*Journ. de phys. et de path. gén.*, mars 1901).

(2) Sullivan, Synthetic Culture media and the Biochemistry of bacterial pigments (*Journ. of med. Research.*, XIV, 1905, p. 109).

(3) Matruchot, Une méthode de coloration du protoplasma par les pigments bactériens (*C. R. de l'Acad. des sc.*, 21 novembre 1898).

du reste, été depuis longtemps signalés par Auché, Voges, Lustig, Beijerinck et Schroeter.

Il est probable que la production de ces pigments est sous la dépendance de diastases, surtout d'oxydases. Il existerait dans le protoplasma une substance spéciale, chromophore ou chromogène, qui, sous des influences déterminées (oxydation ou réduction), produirait le pigment. Par exemple, une fois l'oxydase créée dans le milieu, par sécrétion du microbe évidemment, et certaines modifications du milieu produites, l'oxydase agirait sur le chromophore pour donner le pigment (Lasseur). C'est ainsi qu'en présence de tyrosine, la tyrosinase, ferment oxydant, produit la formation d'un pigment noir. Cette intervention d'une diastase peut expliquer l'action prépondérante d'un élément déterminé, comme le fer pour le *Bacillus chlororaphis* ; on sait que toutes les diastases sont sous la dépendance d'un élément minéral, exemple le manganèse pour la laccase, comme l'a montré Bertrand.

Le rôle physiologique des pigments est peu connu. Ils servent peut-être à fixer l'oxygène dans certaines conditions. En tout cas, leur avidité pour l'oxygène est manifeste ; ils s'oxydent en général très facilement, lorsqu'ils se trouvent sous certaines conditions. La pyocyanine bleue et la chlororaphine verte sont très avides d'oxygène ; il en est de même du pigment du *Bacille violet* et de certains *Bacilles rouges* ; par oxydation, tous ces pigments jaunissent.

Des Bactéries chromogènes peuvent se développer dans l'organisme, où certaines déterminent des troubles importants ; il en est même qui sont nettement pathogènes. Le *Bacillus indicus* tue rapidement les lapins auxquels on en a injecté. D'autres ont une action moins nuisible et beaucoup plus obscure. Le *Bacillus pyocyaneus*, du pus bleu, ne semble jouer aucun rôle dans la suppuration ; les anciens chirurgiens regardaient même l'apparition de la coloration bleue des linges de pansement comme un signe de bon augure. Cette même espèce s'est aussi rencontrée dans la sueur, les sérosités pathologiques (1), avec la même innocuité. Elle peut cependant déterminer chez l'homme une sorte de septicémie grave que l'on n'a encore que rarement observée ; chez le lapin, elle occasionne une maladie expérimentale bien spéciale, étudiée par Charrin (2). Les *Bacilles fluorescents* de Lepierre, de Ducamp et Planchon ont des effets pathogènes évidents. La sueur rouge doit sa coloration à la présence d'une Bactérie, le *Micrococcus hematodes* de Babès (3), qui a de grandes analogies avec le *Micrococcus prodigiosus* ; il se développe très facilement à la base des poils des aisselles et se mêle à la sueur de cette partie du corps.

Le *Beggiatoa rosea-persicina* se développe parfois en telle quantité à la surface de l'eau qu'il colore en rose rouge de grandes étendues de liquide (4). La même chose peut arriver avec les Bactéries chromogènes ; on a observé la coloration rose de quantités considérables de pain due au *Micrococcus prodigiosus*, la coloration bleue de grandes provisions de lait due au *Bacille du lait bleu* ; ce sont là des exemples classiques.

(1) Andouard, Sueur et sérosité bleues (*Journ. de méd. de l'Ouest*, 1879).
(2) Charrin, La maladie pyocyanique. Paris, 1889.
(3) Babès, *Centralbl. für der med. Wissensch.*, 1881, nº 19.
(4) Schnetzler, Ueber eine rothe Färbung des Bretsees (*Bot. Centralbl.*, 1887, nº 33, p. 219).

BACTÉRIES PHOTOGÈNES

La propriété de luire dans l'obscurité n'est pas spéciale aux animaux ; un certain nombre de plantes inférieures présentent aussi le curieux phénomène de la *phosphorescence.* On connaît depuis longtemps plusieurs Champignons qui le montrent ; c'est surtout l'*Agaric de l'olivier*, dont les fructifications, réunies par touffes sur des racines de l'arbre, émettent de belles lueurs blanches pendant la nuit, et l'*Armillaria mellea*, où la partie photogène est les cordons mycéliens qui rampent dans le substratum.

La phosphorescence s'observe chez plusieurs espèces de Bactéries. Pflüger (1) a, le premier, reconnu que les lueurs émises par de la chair de morue fraîche étaient dues au développement à sa surface de petites cellules en suspension dans une glaire visqueuse. Pour lui, ces êtres inférieurs étaient une cause fréquente de la phosphorescence de la mer du Nord.

Cohn (2) rechercha, en 1878, cette espèce, d'après les données de Pflüger, et la nomma *Micrococcus phosphoreus.* Il l'avait rencontrée sur du saumon cuit.

Nuesch (3) retrouva des Bactéries phosphorescentes, en 1877, sur la viande de boucherie ; d'après lui, c'étaient aussi des Microcoques. Bancel et Husson (4) les signalèrent sur du homard conservé. Lassar (5) et Ludwig (6) ont pu étudier ce phénomène sur diverses viandes de boucherie et sur plusieurs espèces de poissons de mer frais.

Fischer (7) et Forster (8) ont signalé une phosphorescence semblable à la précédente, le premier sur des poissons de la mer des Indes, le second sur des poissons de la mer du Nord. Le phénomène était dû à des Bactéries en bâtonnets appartenant à la même espèce, le *Bacillus phosphorescens.*

Giard (9) a observé un phénomène identique sur de petits Crustacés marins, les Talitres, dû à l'infestation par une espèce qui semble différente des précédentes et qui détermine, chez ces animaux, de véritables manifestations épidémiques. C'est sans doute aussi à une Bactérie lumineuse qu'est due la phosphorescence que présentent souvent plusieurs autres animaux inférieurs, en particulier, dans nos régions, les Géo-

(1) Pflüger, Ueber die Phosphorescenz verwesender Organismen (*Arch. für die gesammte Physiol.*, XI, 1875, p. 222).

(2) Cohn, Kryptogamenflora von Schlesien, Bd III, p. 146.

(3) Nuesch, Ueber leuchtende Bacterien. Bâle, 1885.

(4) Bancel et Husson, Sur la phosphorescence de la viande de homard (*C. R. de l'Acad. des sc.*, LXXXVIII, 1879, p. 191).

(5) Lassar, Die Mikrokokken der Phosphorescenz (*Arch. für die gesammte Physiol.*, XXI, 1880).

(6) Ludwig, Micrococcus Pflügeri (*Bot. Centralbl.*, XVIII, n° 11). — Die bisherichen Untersuchungen über photogene Bacterien (*Centralbl. für Bakt.*, II, 1887, p. 372 et 401).

(7) Fischer, Bacteriologische Untersuchungen auf Einer Reise nach Westindien (*Zeitschr. für Hygiene*, I, 1886, p. 421 ; II, 1887, p. 54).

(8) Forster, Ueber einige Eigenschaften leuchtender Bacterien (*Centralbl. für Bakt.*, II, 1887, p. 337).

(9) Giard, *Soc. de Biol.*, 19 octobre 1889 et 25 avril 1890.

philes (1), la Taupe-Grillon (2), et peut-être aussi la phosphorescence des mycéliums des divers Champignons.

D'autres *Bacilles phosphorescents* ont été rencontrés dans des conditions similaires sur des poissons morts, des viandes, des animaux marins, dans l'eau de mer. Plus de détails sur eux seront données plus loin à l'article *Bacilles phosphorescents*, dans la description des espèces.

Herman (3) a isolé un *Microcoque phosphorescent* sur du homard cuit devenu spontanément lumineux.

Kutscher (4) et Dunbar (5) ont isolé d'eaux de fleuves des Bacilles virgules, voisins du *Spirille du choléra*, présentant une phosphorescence très nette.

Molisch (6) dit avoir retrouvé le *Micrococcus phosphoreus* de Cohn sur des viandes de bœuf.

La viande sur laquelle se développent ces Bactéries émet dans l'obscurité des lueurs blanches, parfois un peu verdâtres, en traînées mobiles irrégulières, ressemblant aux sillons qu'une allumette phosphorique laisse sur les objets, lorsqu'on la frotte légèrement à leur surface. La phosphorescence est contagieuse de proche en proche; Nuesch rapporte qu'en une nuit toute la viande d'une boucherie a été envahie. En transportant une petite portion de la substance lumineuse sur un morceau de viande fraîche, celle-ci devient rapidement phosphorescente. La chair de poissons ou d'animaux de boucherie n'est pas le seul milieu où peuvent vivre ces curieuses espèces; elles végètent très bien sur la gélatine. Elles peuvent même subsister assez longtemps dans de l'eau légèrement salée, comme l'eau de mer, en produisant à la surface leur curieuse réaction.

Le temps pendant lequel le substratum reste phosphorescent est variable. Nuesch a eu de la viande qui est restée lumineuse pendant sept semaines à une température ne dépassant pas 10°. La putréfaction fait disparaître le phénomène, les espèces qui l'occasionnent l'emportant sur les Bactéries lumineuses et en déterminant la rapide disparition. La température influe assez peu, dans de certaines limites. Ludwig a observé que la viande de veau luisait encore à — 10°, et qu'une température de — 14° n'arrivait pas à supprimer les lueurs. La viande, mise au bain-marie dans un tube, est encore phosphorescente à 30° ; à 47°, toute lueur a disparu. Les Bactéries de Fischer ne luisent pas au-dessus de 25°. Le froid paraît en général plus favorable au phénomène que la chaleur.

Les conditions dépendent toutefois des espèces sur lesquelles porte l'expérimentation.

La lumière émise est blanche et contient, par conséquent, les différentes radiations du spectre. Avec des cultures de *Micrococcus phospho-*

(1) Macé, Sur la phosphorescence des Géophiles (*Soc. de Biol.*, 1888).

(2) Ludwig, Ueber die Phosphorescenz von Grillotalpa vulgaris (*Centralbl. für Bakt.*, IX, 1891, p. 561).

(3) Herman, La phosphorescence bactérienne (*Le Scalpel*, 25 février 1899).

(4) Kutscher, Zur Phosphorescenz der Elbvibrio (*Centralbl. für Bakt.*, XVIII, 1895, p. 424).

(5) Dunbar, Versuche zum Nachweiss von Choleravibrionen in Flusswasser (*Arb. aus dem Kaiserl. Gesundheitsamte*, IX, 1894, p. 379).

(6) Molisch, Ueber das Leuchten des Fleisches (*Centralbl. für Bakt.*, 2te Abth., IX, 1902, p. 725).

reus, Ludwig (1) a obtenu un spectre continu depuis la raie *b* de Fraunhofer jusque dans le violet.

L'air paraît être nécessaire à la production du phénomène ; les cultures ne luisent pas en l'absence d'oxygène. Le sel semble favoriser ce développement de lueurs. Les Bactéries ne luisent pas sur tous les milieux où elles peuvent vivre, ce qui doit faire dépendre la phosphorescence du mode de nutrition des espèces qui la présentent. On ne connaît rien de plus des conditions physiologiques de cette curieuse propriété. La lumière ne semble avoir aucune action sur sa production ; des cultures faites à l'obscurité luisent tout aussi bien que celles développées au grand jour.

C'est très probablement à la présence de ces Bactéries, ou d'espèces semblables, qu'il faut attribuer le curieux phénomène de la phosphorescence de liquides de l'organisme, normaux ou pathologiques, le lait, l'urine, la sueur, la salive, le pus. On en trouve mention de quelques cas dans les anciens auteurs. Henkel (2) rapporte l'histoire d'un fait bien net de sueurs phosphorescentes. Le sujet suait beaucoup ; lorsqu'il se déshabillait dans l'obscurité, la surface de son corps et sa chemise étaient parcourues en tous sens par des traînées lumineuses semblables à des sillons d'allumettes phosphoriques. Tout disparaissait à la lumière et l'on ne remarquait sur la peau que de petites macules rouges. L'individu exhalait une odeur spéciale, urineuse, plutôt acide qu'ammoniacale, rappelant la choucroute trop fermentée. Nuesch (3) a pu observer à nouveau ce phénomène sur un pêcheur ; il l'a malheureusement peu étudié. Il n'a rien qui doive étonner et rappelle les cas de coloration de plusieurs des sécrétions normales, sueur, lait, salive, par des Bactéries qui les teignent en rouge, bleu, etc.

On est réduit à de pures hypothèses sur le mode de production des matières photogènes. Il y a peut-être intervention de ferments solubles. Dubois (4) a signalé chez un Mollusque marin, dont le manteau est phosphorescent et doit peut-être sa phosphorescence à la présence à sa surface de Bactéries lumineuses, *Pholas dactylus*, la présence de deux substances cristallisables qui, mises en contact en présence de l'eau, produisent la phosphorescence. L'une d'elles paraît être une diastase : l'auteur propose de la nommer *luciférase*. Il est très probable qu'il se passe des faits du même ordre pour les Bactéries phosphorescentes.

Pour Herman, les actions mécaniques, les frottements surtout, seraient à mettre en cause ; c'est souvent, en effet, dans les conditions où ils interviennent que la phosphorescence s'observe. L'état électrique de l'air pourrait aussi intervenir dans la production du phénomène.

La *fonction photogène* est chez les microbes une propriété biologique tout comme la fonction chromogène. Comme cette dernière, comme toutes les autres fonctions vitales, nous l'avons vu, elle est influencée par beaucoup de conditions qui agissent sur la nutrition générale, sur

(1) Ludwig, Ueber die spectroscopische Untersuchung photogener Pilze (*Zeitschr. für wiss. Mikrosc.*, I, 1884, p. 181).

(2) Henkel, Sudor phosphorescens materiæ phosphori argumentum (*Acta physico-medica Acad. cæs. Leop. Car. naturæ curiosorum*, vol. V, p. 332, 1740).

(3) Nuesch, *Loc. cit.*, p. 147.

(4) Dubois, Sur la fonction photogénique chez les Pholades (*C. R. de la Soc. de Biol.*, 1887, p. 564). — Sur la luciférase ou zymase photogène des animaux et des végétaux (*C. R. de l'Acad. des sc.*, t. CXXVIII, 1896, p. 653).

la vie du microbe (1) ; elle s'atténue et disparaît, ou se maintient et s'exalte suivant les conditions de milieu que rencontre l'espèce. C'est, comme la fonction chromogène, comme la fonction pathogène, comme la fonction de ferment, une propriété contingente qui n'est pas nécessaire à la vie de l'espèce, que l'espèce peut même perdre complètement sans cesser de pouvoir vivre, comme nous avons vu des espèces typiquement chromogènes se reproduire abondamment et indéfiniment sans plus sécréter de pigment, ou de vraies espèces pathogènes, atténuées à la dernière limite, pour ainsi dire transformées en véritables saprophytes.

(1) Suchsland, Physikalische studien über Leuchbakterien (Ref. in *Centralbl. für Bakt.*, 2te Abth., IV, 1898, p. 713).

DEUXIÈME PARTIE

TECHNIQUE BACTÉRIOLOGIQUE

CHAPITRE PREMIER

MÉTHODES DE RECHERCHE ET D'ÉTUDE DES BACTÉRIES

I. — INSTRUMENTS

1° Microscope et accessoires.

L'instrument indispensable pour toutes recherches de bactériologie est un bon microscope. On trouvera dans les traités spéciaux la description et l'usage des microscopes composés bien perfectionnés qui sont fournis par les principaux constructeurs de France et de l'étranger (1). Voici quelques détails touchant de plus près le sujet qui nous occupe.

Parlons d'abord de la partie mécanique. Elle a, pour ce genre d'études, une importance assez grande. Les petits modèles de microscope ne peuvent d'habitude pas servir. On aura certainement grand avantage à user de grands ou moyens modèles ; leurs accessoires, bien perfectionnés depuis ces dernières années, trouveront souvent leur emploi, pour la plus grande commodité de l'observateur et la plus grande sûreté de l'observation. La seule limite doit être ici le prix à consacrer à l'achat. Il faut, si faire se peut, choisir au moins un moyen modèle, pourvu d'une crémaillère, pour la mise au point rapide, et de l'appareil d'éclairage connu sous le nom de *condenseur Abbé*, qui rend des services très signalés et doit être considéré comme indispensable à l'étude des Bactéries et en général à l'emploi des objectifs à immersion homogène. Ce condenseur ne s'adapte pas facilement aux petits modèles de microscopes fournis par les fabricants cités ; c'est la raison principale de leur insuffisance. On se rend facilement compte de sa disposition sur les figures 41 et 42, qui représentent des microscopes munis de cet appareil.

L'*appareil d'éclairage Abbé* est une modification heureuse de l'ancien système de Dujardin. Il se compose essentiellement d'un système optique formé de deux ou trois lentilles, destinées à concentrer la lumière sur la préparation (fig. 43). On le place sous la platine du microscope, de façon que la lentille supérieure vienne, en entrant dans l'orifice de la platine, affleurer à la face inférieure de la lame porte-objet, avec

(1) Les maisons les plus avantageusement connues sont entre autres : Nachet, 17, rue Saint-Séverin ; Vérick (Stiasnié, successeur), à Paris ; Zeiss, à Iéna ; Leitz, à Wetzlar ; Reichert, à Vienne, VIII, Bennogasse, 24-26 ; Powell et Lealand, à Londres. Leurs catalogues sont envoyés sur demande.

laquelle elle peut se mettre en contact direct. Le condenseur est porté (fig. 41) par un collier G, dans lequel il entre à frottement dur ; on peut facilement le remplacer par une pièce de forme analogue sur laquelle

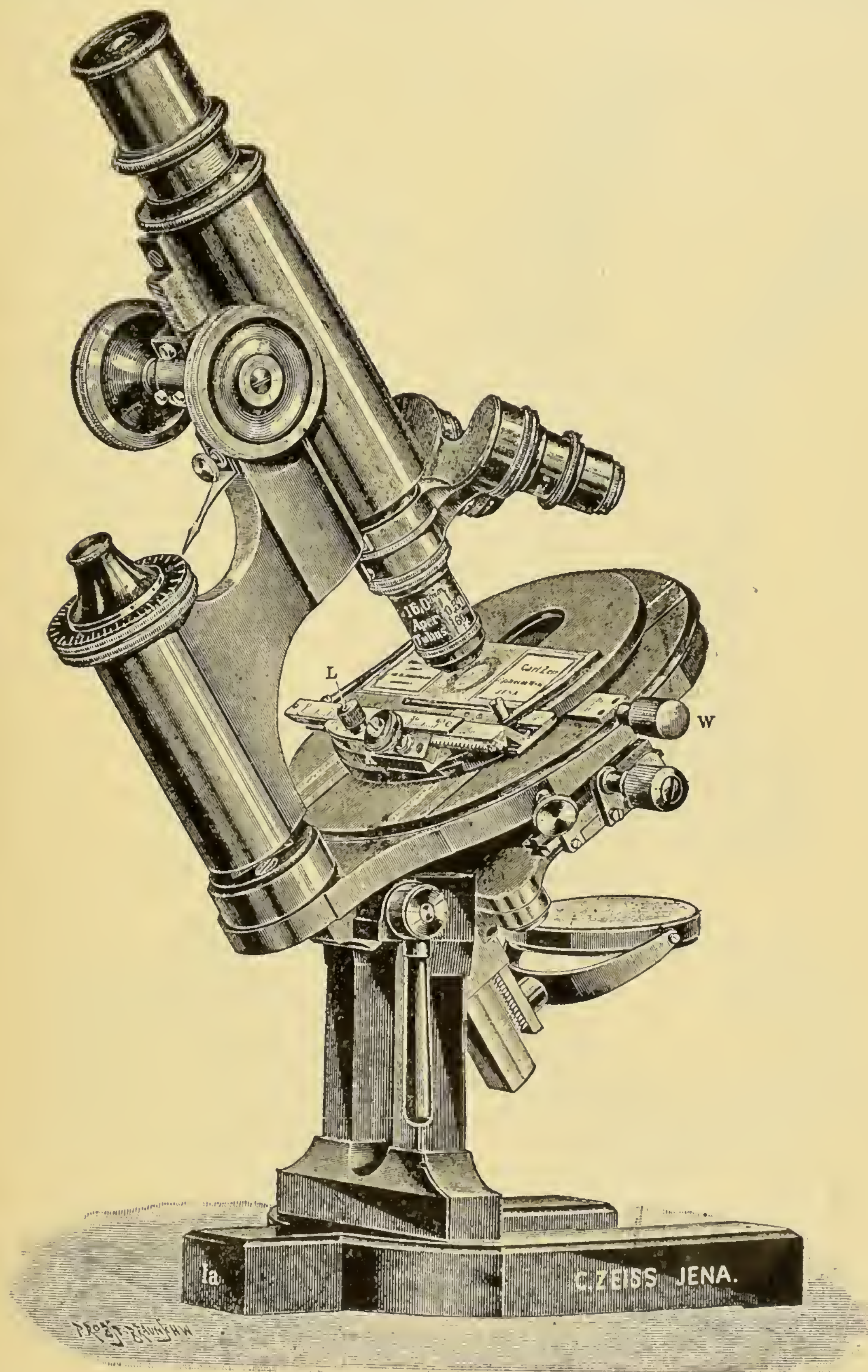


Fig. 41. — Statif I^a de Zeiss.

se logent les diaphragmes ordinaires, lorsqu'on le juge nécessaire. A ce système optique est annexé un appareil porte-diaphragmes spécial. C'est un tambour surbaissé L, dans lequel on peut installer une série de disques percés de trous de grosseurs différentes ou un disque à centre

plein, réuni à la circonférence par deux ou trois rayons, destiné à donner le champ noir en supprimant la lumière centrale. Pour changer les disques, on fait pivoter le tambour en tirant le bouton que l'on voit

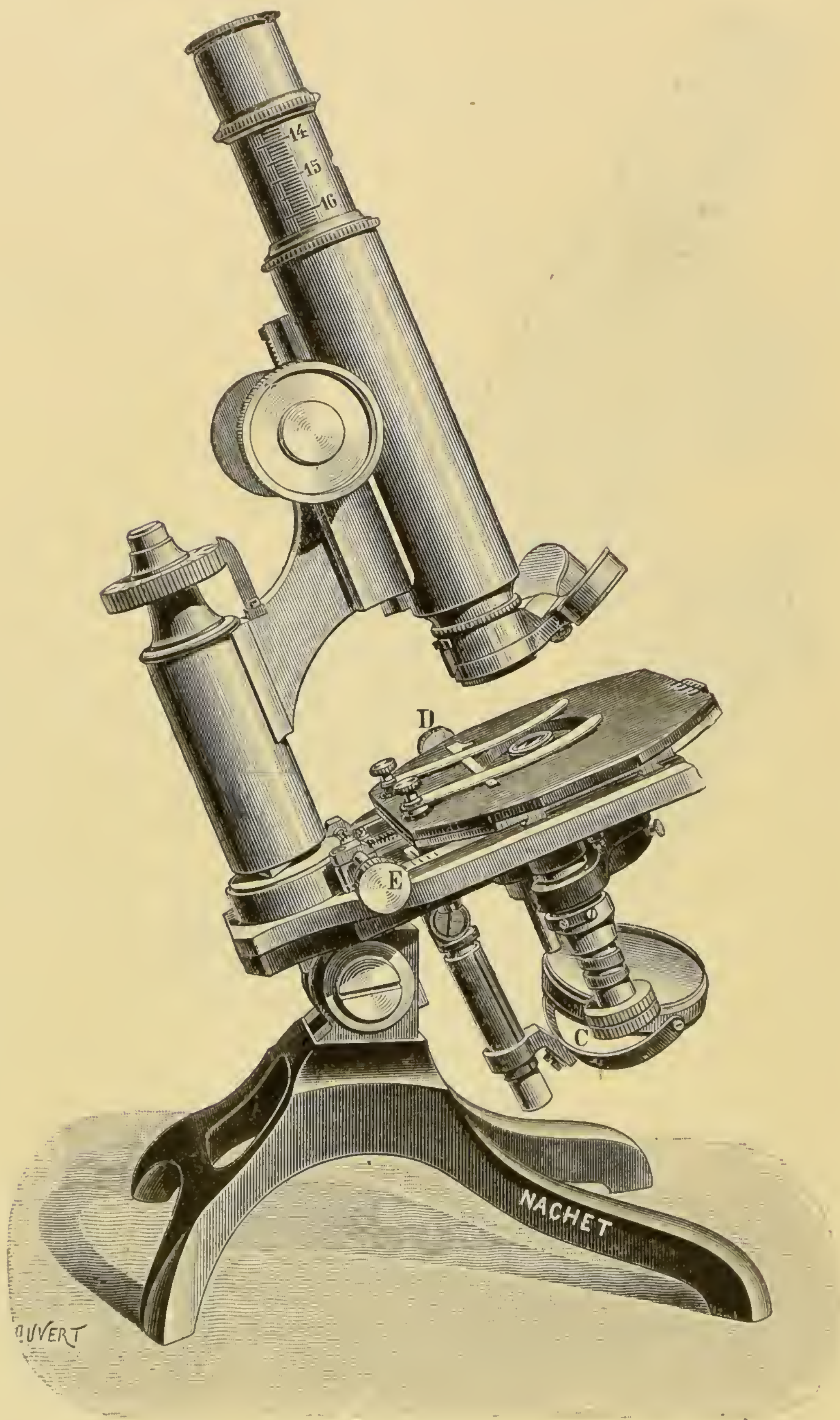


Fig. 42. — Nouveau microscope grand modèle (Nachet).

à gauche de la figure. Ce bouton commande une crémaillère M, qui fait avancer ou reculer l'anneau porte-diaphragme et décentre ainsi l'ouverture du disque, ce qui fait tomber sur la préparation des rayons de lumière oblique. Au-dessous se trouve un miroir à deux faces, l'une

plane, l'autre concave. On a avantage, le plus souvent, à se servir de la première ; avec les objectifs très faibles, cependant, il serait difficile d'éclairer régulièrement tout le champ avec le miroir plan : il faut employer le concave.

Les constructeurs remplacent très avantageusement, dans les modèles nouveaux, tous ces disques diaphragmes mobiles par un *diaphragme iris* (fig. 45) formé de lames mobiles les unes sur les autres, fixé dans

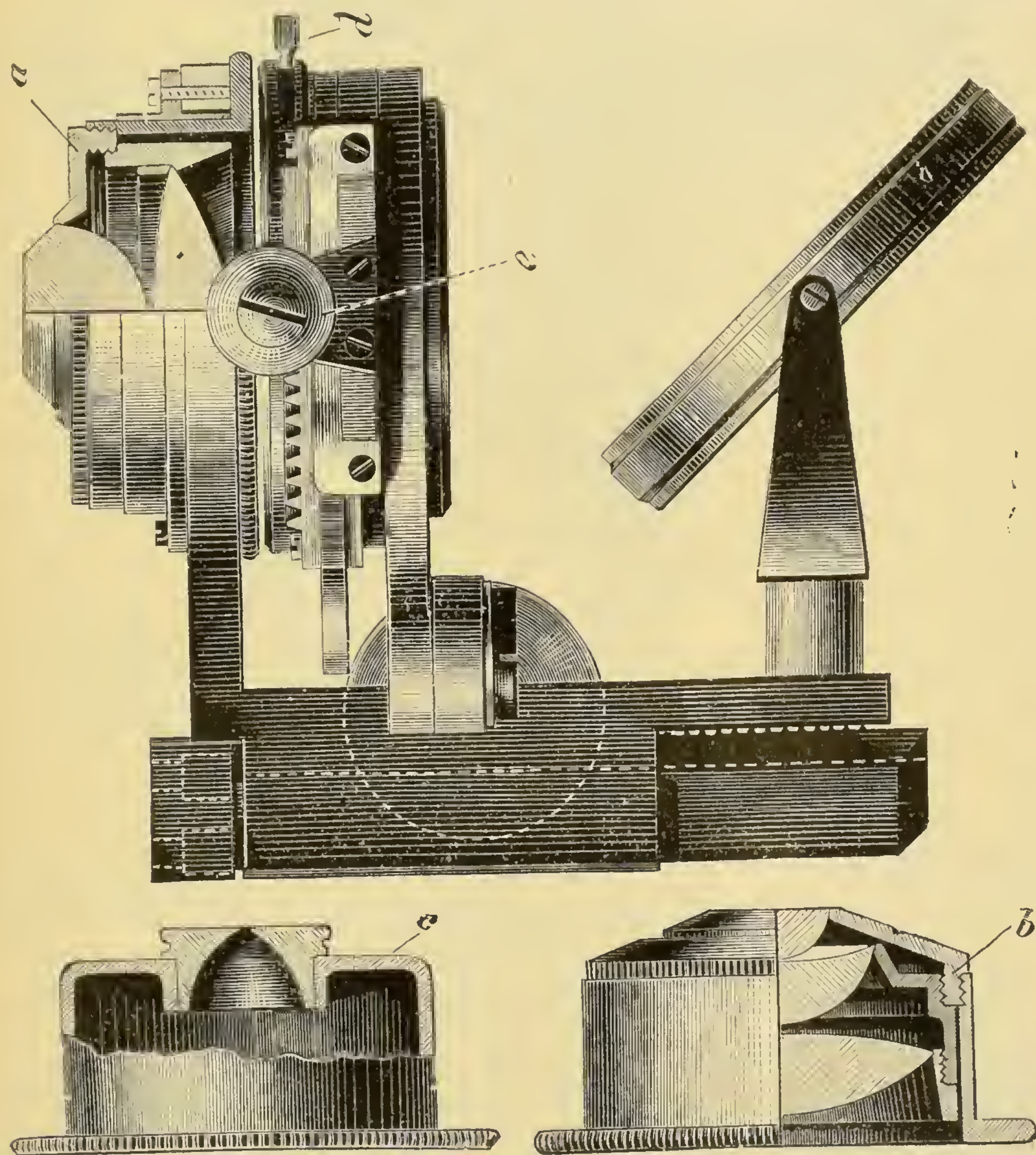


Fig. 43. — Appareil d'éclairage Abbé.

le tambour du condenseur, qui permet de réduire ou d'agrandir l'ouverture centrale à volonté, d'une façon lente et graduelle, sans rien changer dans l'appareil, en faisant simplement mouvoir un bouton moletté. Pour obtenir le fond noir, il faut se servir d'un disque à centre plein que l'on met en place après avoir ouvert complètement l'iris.

Tout l'appareil peut s'élever ou s'abaisser à volonté à l'aide d'une crémaillère que l'on met en mouvement en tournant le bouton A ; on peut ainsi facilement diminuer l'intensité de l'éclairage en abaissant le condenseur, ce qui est surtout nécessaire lorsqu'on use d'objectifs faibles. Souvent même on doit enlever le système optique pour examiner à de faibles grossissements ; si l'on veut diaphragmer, on se sert alors

des diaphragmes ordinaires, portés par le cône mis à la place du condenseur.

L'emploi des diaphragmes s'apprend surtout par l'expérience. Le

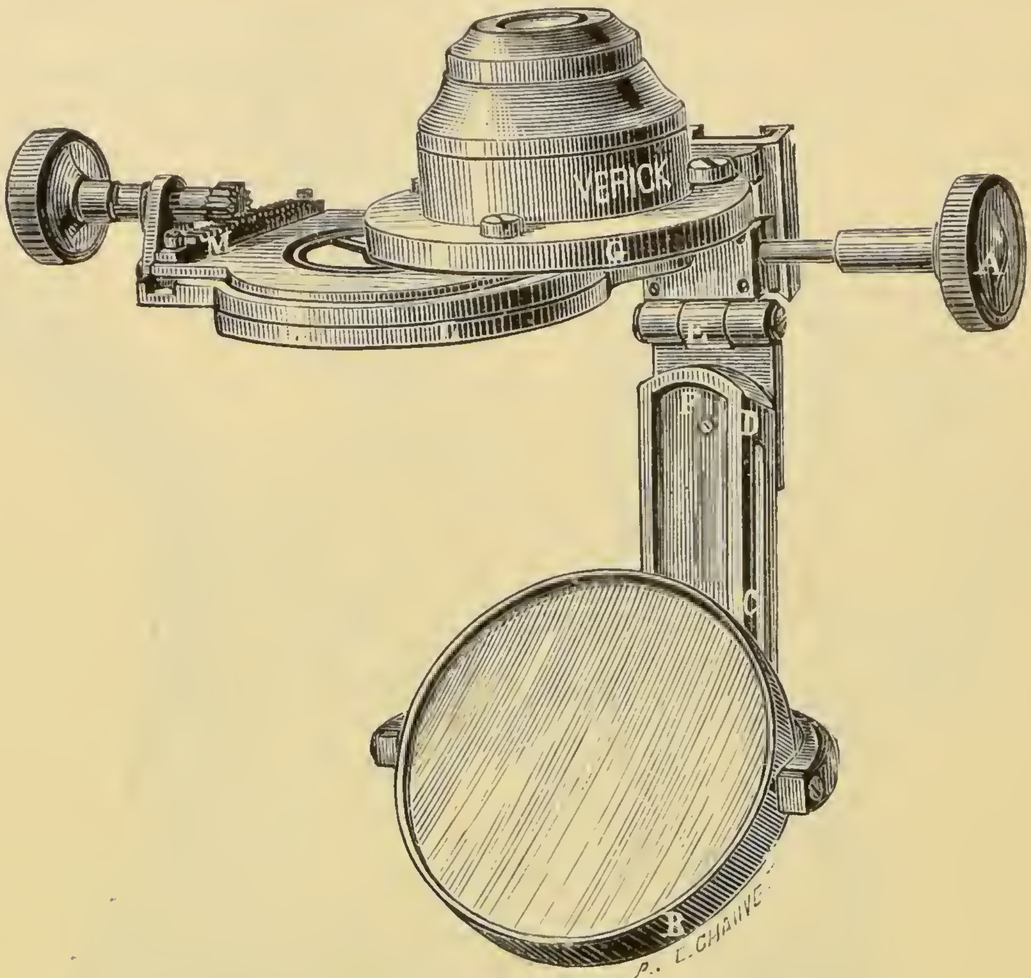


Fig. 44. — Éclairage du microscope Vérick.

diamètre de l'orifice du diaphragme doit varier suivant le grossissement de l'objectif employé et l'intensité de la lumière; les objectifs forts demandent, en général, de petits diaphragmes; les faibles, des moyens ou des gros. Il est du reste facile de choisir en appréciant les différences de netteté des images. Si l'on enlève tout disque de l'appareil et qu'on laisse libre l'ouverture du tambour L (fig. 44), il arrive dans le cône du système optique un flot de lumière qui noie tous les détails peu marqués de la préparation et ne laisse voir distinctement que les objets colorés. C'est le moyen recommandé par Koch pour rechercher, dans les tissus incolores ou faiblement colorés, les Bactéries qui s'y trouvent et qui ont été colorées par un des procédés indiqués ci-après. C'est du reste par un usage quotidien, plus que par de longues explications, que l'on apprendra à se servir commodément et utilement de l'appareil.



Fig. 45. — Diaphragme iris.

La platine devra être aussi large que possible ; elle est d'ordinaire un peu étroite dans la plupart des modèles, ce qui souvent ne permet pas, lorsqu'on examine des cultures sur plaques, d'amener certaines colonies dans le champ de l'objectif. Il est alors très commode, souvent

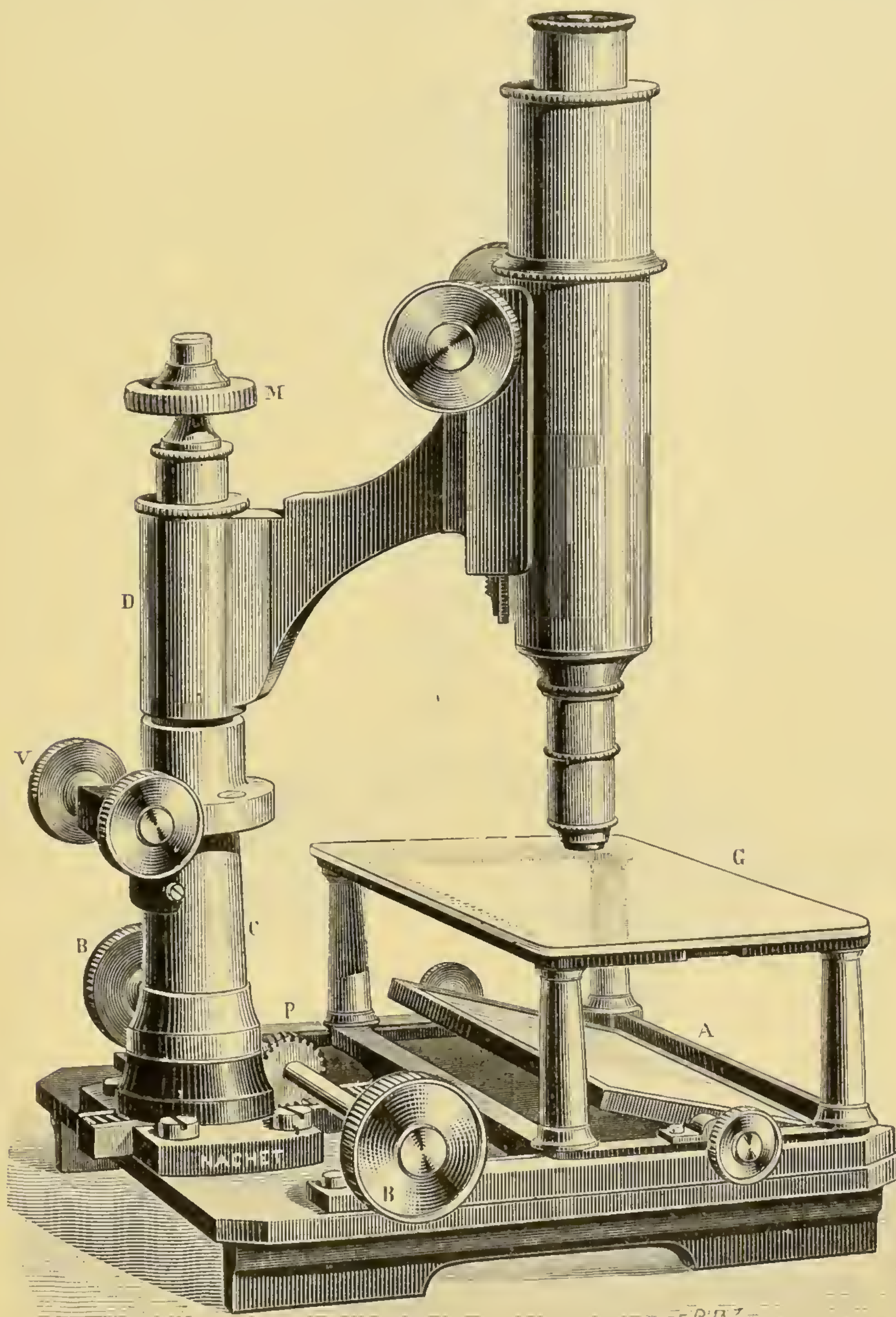


Fig. 46. — Nouveau microscope à grand champ de vision (1/3 de grandeur réelle).

même indispensable, d'user d'un modèle spécial, à grand champ de vision, tel que celui représenté figure 46, construit par la maison Nachet, qui permet d'examiner facilement de grandes surfaces. Une platine mobile bien comprise et facile à enlever, construite, par exemple, sur le modèle des constructeurs anglais Ross et Swifft, est d'une très grande commodité. On conçoit, en effet, que lorsqu'il s'agit d'observer des objets de si faibles dimensions, les doigts, même les plus exercés, ser-

vent mal ; des mouvements imperceptibles font sortir du champ du microscope, quand on emploie surtout de très forts objectifs, des points intéressants de la préparation qu'il est souvent difficile de retrouver après. Le chariot mobile permet de mouvoir la préparation en toute sûreté et, de plus, laisse prendre des repères, qui font retrouver facilement les détails que l'on veut étudier à nouveau sur les préparations.

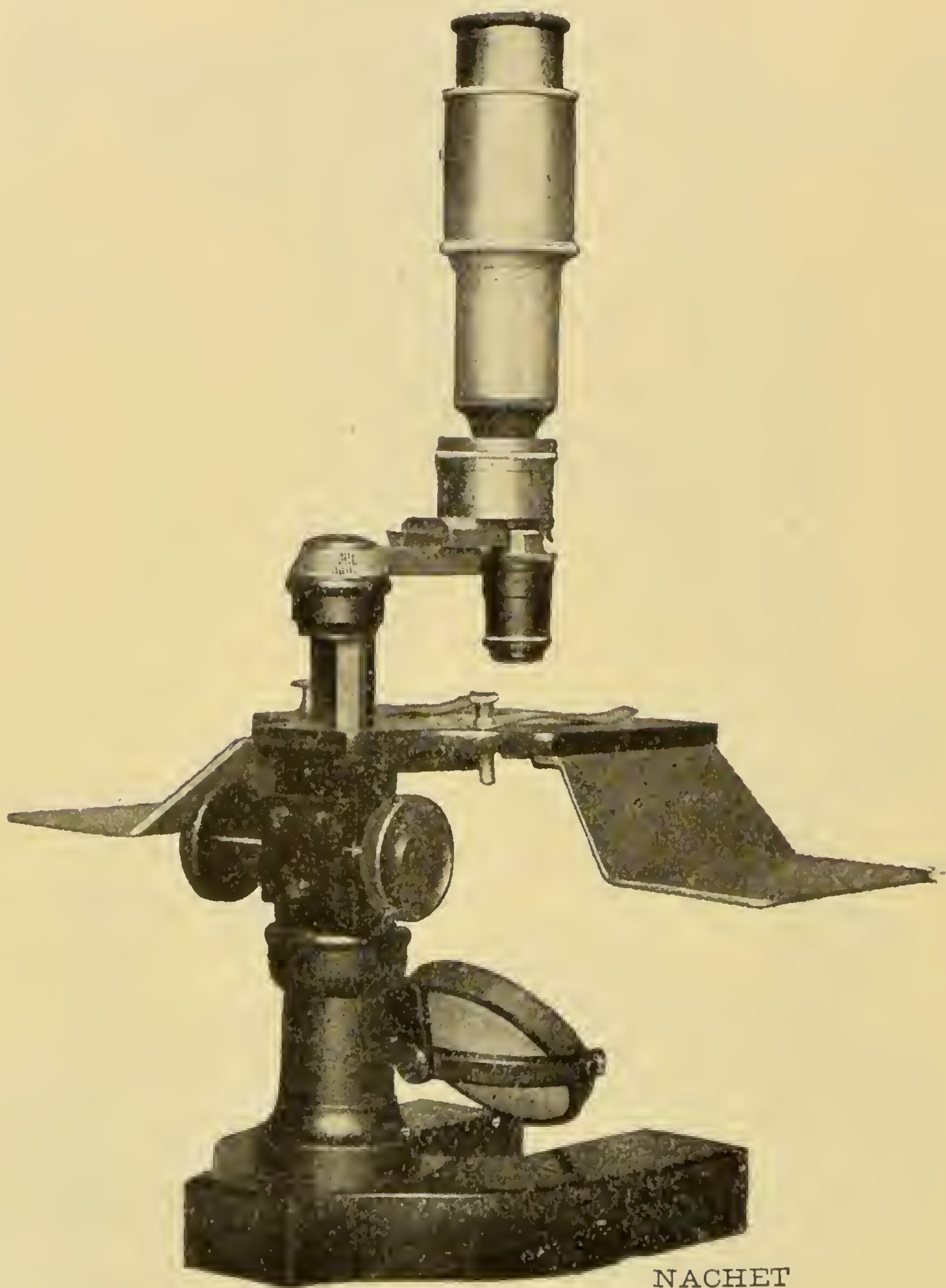


Fig. 47. — Microscope redresseur pour le prélèvement des colonies (Maison Nachet).

Pour le prélèvement des colonies, en cultures sur plaques surtout, le microscope représenté figure 47, construit par la maison Nachet, est d'une très grande commodité. Il est muni de prismes redresseurs, de deux objectifs spéciaux, donnant l'un un grossissement de 25 diamètres avec 4 centimètres de distance focale, l'autre un grossissement de 50 diamètres environ avec 13 millimètres de distance focale. Les manipulations nécessaires se font avec une facilité toute spéciale, grâce au redressement de l'image et à la longueur du foyer.

Est-il besoin de signaler les services que rend le revolver porte-objec-

tif? On en construit d'excellents à trois ou quatre branches, qui permettent d'avoir de suite à sa disposition les trois systèmes optiques à emploi courant, un objectif faible, un fort à sec et un à immersion dans l'huile.

Les changeurs d'objectifs à coulisse de Zeiss offrent aussi de très grands avantages. Chaque objectif peut être facilement centré une fois pour toutes par celui qui s'en sert; le foyer ne change guère et, de plus, on peut se servir d'un nombre indéterminé d'objectifs.

Pour l'examen des grandes surfaces, et tout particulièrement pour l'étude si importante des cultures sur plaques, il est très avantageux de pouvoir se servir de pieds de microscopes spéciaux, tels que les microscopes à grand champ de vision construits par Nachet, et représentés figures 46 et 47. La préparation placée sur le cadre en verre G peut être déplacée d'avant en arrière suivant une marche de 8 centimètres au moyen d'une crémaillère; le corps de microscope D peut lui-même pivoter sur son axe. On obtient ainsi des mouvements longitudinaux et transversaux d'une grande étendue.

La partie optique du microscope a une tout autre importance que la partie mécanique. Trois objectifs sont à conseiller : un faible, un fort à sec et un à immersion homogène.

L'objectif faible doit être à petit grossissement et à long foyer. Il sert surtout à l'examen des colonies, à la constatation de leurs formes et de leur pureté. La longueur de foyer est surtout utile quand on doit puiser dans ces colonies avec un fil de platine ou la pointe d'une aiguille, qui en ramènent une parcelle à examiner ou à ensemencer dans un autre milieu, pour obtenir une culture pure. Les objectifs 0 de Vérick, AA de Zeiss, remplissent très bien ce but. Dans bien des cas, les objectifs à grossissement variable, plus faibles que les premiers, de ces mêmes constructeurs, 0* de Vérick, *a** de Zeiss, sont d'une très grande commodité. On peut, à l'aide d'un collier mobile, qui se trouve sur la monture de ces objectifs, à l'endroit où se met le collier des objectifs à correction, faire varier le grossissement dans la proportion 1 : 2,5 ou 3, en écartant plus ou moins les lentilles. Ce collier porte un index qui arrive, lorsque l'anneau est monté le plus haut possible, au zéro d'une échelle graduée de zéro à 10; les deux lentilles internes ont alors leur écartement maximum, le grossissement est le plus faible. En tournant graduellement le collier, on rapproche les deux lentilles, le grossissement augmente en proportion. Naturellement, dans ce cas, la longueur focale diminue : elle est en raison inverse du grossissement.

L'objectif fort à sec doit être choisi parmi les plus forts du constructeur. L'usage du 9 de Vérick, du F de Zeiss ou d'un similaire d'autres constructeurs est à recommander. On peut, avec ces objectifs, obtenir, avec la série d'oculaires, des grossissements variant de 600 à 1 200 diamètres, parfaitement suffisants pour observer avec fruit les préparations naturelles ou colorées des Bactéries et préparer l'emploi des systèmes à immersion.

Bien des particularités d'êtres si petits échappent à la puissance résolutive des objectifs à sec, même des meilleurs; aussi le bactériologiste est-il obligé souvent, sinon toujours, au moins dans les observations approfondies, de recourir aux *systèmes à immersion*. On emploie depuis longtemps les objectifs à immersion dans l'eau, qu'a fait connaître,

dès 1844, le physicien italien Amici ; on préfère aujourd'hui ceux à immersion dite *homogène*.

Pour supprimer les inconvénients qui résultent de la réfraction violente des rayons qui, sortant du couvre-objet, entrent dans l'air, et de la nouvelle réfraction qu'ils subissent en entrant dans la lentille frontale de l'objectif, on avait d'abord interposé, entre l'objectif et la lamelle, une gouttelette d'eau qui supprimait en grande partie ces différences de réfraction et augmentait en outre le nombre des rayons arrivant à l'objet en diminuant la déviation de ceux qui sortent du couvre-objet. L'eau ne remplit qu'en partie le but proposé : son indice de réfraction est en effet plus faible que celui du verre des lentilles (eau : 1,336 ; — crown : 1,500). On s'est donc appliqué à trouver des liquides possédant un indice de réfraction très voisin de celui du verre. Certaines huiles, pures ou mélangées, ont un indice de réfraction et un pouvoir dispersif sensiblement égaux à ceux du crown-glass; en interposant de ce liquide entre la lentille frontale de l'objectif et la lamelle couvre-objet, on forme un *milieu homogène* pour les rayons lumineux. Si la préparation est montée dans le baume de Canada ou le dammar et qu'on dépose une goutte du liquide d'immersion entre la lame porte-objet et le condenseur, le résultat est meilleur encore, les rayons ne subissant que peu de changement depuis leur sortie de la lentille supérieure du condenseur jusqu'à leur arrivée dans l'objectif. On obtient ainsi des images bien supérieures comme clarté et netteté à celles fournies par les anciens objectifs à immersion dans l'eau. C'est cette tendance à uniformiser la réfraction dans les différents milieux que doivent traverser les rayons qui a fait donner à ce procédé le nom d'*immersion homogène*. Les liquides employés varient suivant les constructeurs, et il est bon jusqu'alors de n'employer pour un objectif donné que le liquide indiqué par son fabricant. Zeiss emploie l'essence de cèdre épaissie par une longue exposition à l'air, en couches minces (indice de réfraction = 1,515) ; d'autres recommandent l'huile de ricin additionnée d'huiles essentielles, ou des huiles essentielles pures. Tout liquide à indice de réfraction égal doit *a priori* être bon, si cependant il ne risque pas d'endommager l'objectif.

Après usage, on enlève facilement l'huile sur la préparation ou sur l'objectif avec un tampon d'ouate ou un linge fin, imbibés d'alcool, de xylol ou de benzine pure, ou même à sec.

Ces objectifs sont d'habitude construits sans correction, parce qu'un écartement un peu fort des lentilles nuirait beaucoup à la perfection de l'image ; ils sont corrigés pour une épaisseur moyenne de couvre-objets. Du reste, l'épaisseur des couvre-objets n'influe sur eux que dans de très larges limites.

Les objectifs *homogènes apochromatiques* de Zeiss, et ceux que possèdent aujourd'hui tous les bons constructeurs, sont certainement à recommander. Ils se distinguent par une correction parfaite de l'aberration chromatique et l'aberration de sphéricité.

Les objectifs à immersion à eau, ordinaires ou apochromatiques, sont souvent d'une grande commodité, en permettant d'observer les préparations faites sur lame porte-objet, sans interposition de lamelle et sans être obligé d'immerger la préparation dans l'essence.

Les systèmes oculaires sont moins importants que les objectifs; leur

construction, bien moins délicate, ne demande pas des soins si minutieux et des calculs aussi compliqués. Zeiss construit, spécialement pour ses objectifs apochromatiques, des oculaires dits *compensateurs*, destinés à corriger, pour l'observateur, certains défauts de l'image de l'objectif. Ces oculaires s'emploient aussi avec les objectifs à grand angle d'ouverture, de l'ancienne série de ce constructeur. Il les numérote 1, 2, 4, 8, 12, 18, le numéro désignant le grossissement oculaire de chacun d'eux. Dans ces conditions, si l'on a déterminé une fois pour toutes le pouvoir grossissant de chacun des objectifs que l'on possède, on arrivera bien vite à la mesure du grossissement total du microscope avec un assemblage optique donné. Il suffira de multiplier ce dernier chiffre par le numéro de l'oculaire ; on sait, en effet, que le grossissement d'un microscope est égal au produit du grossissement de l'objectif par celui de l'oculaire. Il faut, en tout cas, n'opérer qu'avec une longueur de tube toujours identique. L'emploi des oculaires chercheurs, à grossissement très faible, et surtout d'un oculaire à grand champ, comme celui que construit la maison Nachet, peut donner d'excellents résultats, particulièrement pour l'examen des cultures microbiennes.

Une *loupe montée* sera dans bien des cas d'une grande utilité. Elle servira à étudier la forme et l'aspect des colonies que donnent les Bactéries sur les milieux où on les cultive. Elle est indispensable pour une numération exacte dans les cultures sur plaques. Les constructeurs cités en possèdent de très beaux modèles.

La recherche des Bactéries dans l'intérieur des tissus nécessite l'emploi de *microtomes*, permettant d'obtenir des coupes suffisamment minces. On connaît ces instruments, qui sont d'un usage courant dans les laboratoires. On peut user de petits microtomes à main ou, mieux, des grands modèles à glissière en métal, construits, sur le principe de l'ancien microtome en bois de Rivet, par la plupart des constructeurs. Yung (de Heidelberg) et Vérick (de Paris) en fabriquent de différentes tailles avec tous les perfectionnements que l'on sait.

Ultramicroscopie.

La puissance du microscope a des limites. Il y a des objets trop petits pour être vus aux plus forts grossissements, avec les meilleures combinaisons optiques, et parmi eux beaucoup d'êtres vivants, de microbes, ces *microbes invisibles*, déjà nombreux, dont il a été parlé précédemment (p. 16). On a appelé ces objets *ultramicroscopiques* ; on les met en évidence à l'aide des *appareils ultramicroscopiques*.

Les termes *ultramicroscopie*, *ultramicroscope* et *ultramicroscopique* peuvent faire penser qu'il s'agit d'emploi de grossissements plus forts que ceux dont on dispose d'habitude. Il n'en est rien. On se sert uniquement des objectifs et oculaires en usage pour les examens microscopiques ordinaires. Le mode d'emploi seul diffère.

L'expérience démontre qu'on ne peut reconnaître ni forme ni grandeur à un objet dont les dimensions sont un peu au-dessous d'une longueur d'onde, vers 0,4 μ par exemple. Si les dimensions diminuent encore un peu, 0,3 μ, 0,2 μ, il devient impossible de le distinguer, même avec les meilleures combinaisons optiques, avec l'éclairage habituel, en transparence.

Il est en outre des microbes de dimensions ordinaires que leur très grande transparence empêche de distinguer au microscope où ils sont entièrement noyés et fondus dans le flot de lumière envoyé par l'éclairage employé par-dessous. Ceux-là sont justiciables aussi des procédés de l'ultramicroscopie.

Le principe de la méthode est le suivant : un objet trop petit ou trop transparent pour être vu au microscope employé comme d'habitude y devient visible s'il est suffisamment lumineux par lui-même et s'il se détache alors sur un fond noir.

Si l'objet a des dimensions au-dessous de la limite de visibilité, on ne lui distingue pas de forme ; particule opaque très éclairée, il se comporte comme s'il était une source de lumière et apparaît comme un simple point lumineux. C'est ce que l'on observe, par exemple, avec des cul-

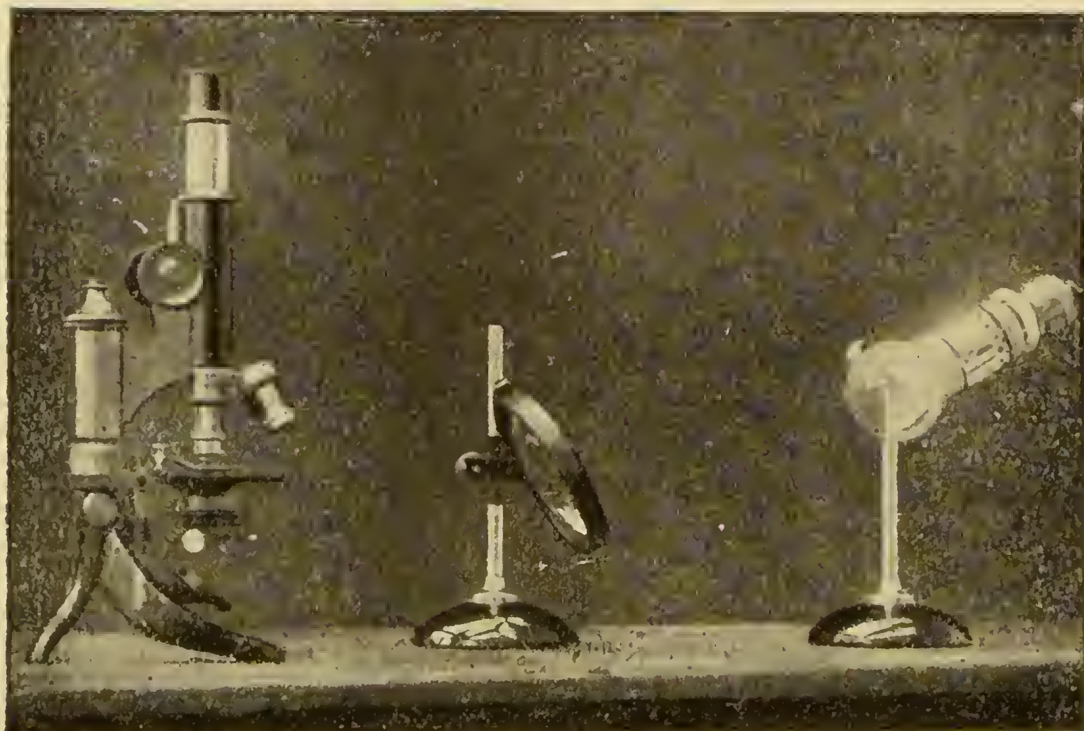


Fig. 48. — Disposition d'installation ultramicroscopique de Leitz.

tures du microbe de la *péripneumonie des bovidés*, où l'on distingue à l'ultramicroscope de nombreux petits corpuscules brillants animés de mouvements en tout semblables aux mouvements browniens. On obtiendrait de mêmes résultats pour d'autres microbes de très petites dimensions, dits *microbes invisibles* ou *microbes filtrants*.

Si l'objet a des dimensions suffisantes, mais est trop transparent pour se distinguer avec les dispositifs habituels, fortement éclairé il apparaît sur le fond noir comme une forme lumineuse ayant son aspect spécial, ses mouvements s'il en possède, ses dimensions. Il devient facile à caractériser. C'est ce que l'on observe en particulier avec le *Spirochète de la syphilis* ou d'autres Spirochètes voisins.

Les conditions essentielles à remplir sont un fond noir et un fort éclairage latéral de la préparation. Le fond noir s'obtient facilement avec des dispositions simples. L'éclairage latéral peut se réaliser différemment suivant les appareils, soit par l'interposition, sous la préparation, de prismes de forme voulue, comme dans l'appareil de Cotton et

Mouton, soit en se servant d'un condensateur parabolique ou sphérique, comme dans les appareils de Zeiss et de Leitz.

Comme source lumineuse, il faut une lumière intense, blanche et fixe ; on peut prendre l'arc, le bec Auer, l'acétylène, la lampe Nernst. Les rayons doivent être condensés sur le miroir avec une forte lentille.



Fig. 49. — Spirochètes, globules rouges, graines et amas de mucine et d'albumine (Dr Gastou).

Une disposition facile est indiquée par la figure 48.

Il est à recommander d'éviter la pénétration de rayons lumineux dans l'objectif. L'emploi d'objectifs à immersion homogène donne de meilleurs résultats, l'huile empêchant la dispersion des rayons. Il faut, en outre, chercher à n'éclairer dans un champ qu'un nombre restreint de particules microscopiques ; lorsque ces dernières sont trop nombreuses, leurs images lumineuses sont trop rapprochées, se nuisent, se fusionnent.

Quand on veut se servir couramment d'un dispositif, on a très grand intérêt à faire le repérage exact des différentes pièces, lampe, lentille, miroir, et à déterminer le centrage de l'appareil à fond noir. On s'évite, de cette façon, bien des tâtonnements inutiles.



Fig. 50. — Urine avec nombreux microbes et amas albumineux (Dr Gastou).

La mise au point s'obtient facilement en abaissant progressivement l'objectif d'abord placé trop haut. En approchant, on aperçoit d'abord un éclairage diffus, puis l'obscurité, enfin le fond noir s'éclaire par places, montrant lumineux des points, des filaments, des amas, suivant le cas mobiles ou immobiles. Ce que l'on distingue alors varie avec la nature de la préparation que l'on examine ; les figures 49 et 50, empruntées à Gastou, peuvent en donner une idée.

Lorsqu'on cherche à voir des microbes mobiles, à constater et à apprécier la nature des mouvements, il faut éviter de déterminer dans le liquide de la préparation des courants qui puissent communiquer des

mouvements artificiels, de simple entraînement. On ne doit pas faire de mélanges de liquides de densité différente, empêcher l'évaporation trop forte en lutant en partie à la paraffine et surtout, comme l'indique avec raison L. Spillmann, obtenir une horizontalité parfaite de la platine du microscope avec un niveau à bulle d'air et au besoin l'usage d'une planchette à vis coulantes.

Des détails plus spéciaux seront encore donnés à propos du *Spirochète de la syphilis* dont la recherche et la constatation sont particulièrement facilitées par l'emploi de l'ultramicroscope. Des indications très complètes sur l'ultramicroscopie et ses applications cliniques se trouvent exposées dans les ouvrages de Cotton et Mouton (1) et de Gastou (2).

Mensuration des objets.

En bactériologie, comme dans toute étude de cytologie, une chose importante et délicate est la détermination du diamètre réel des objets que l'on observe. La difficulté tient surtout ici aux dimensions très faibles des Bactéries, qui ne mesurent d'ordinaire que quelques millièmes de millimètre et parfois même de simples fractions de cette quantité. On sait qu'on prend habituellement le millième de millimètre comme unité de grandeur en microscopie ; on le représente par la lettre grecque μ et on l'appelle *micron* ou, plus simplement, *mu*.

Pour arriver à cette mensuration, on se sert du *micromètre oculaire* et du *micromètre objectif*. Ce dernier instrument est un porte-objet sur lequel a été gravé au vernier 1 millimètre divisé en cent parties égales : chacune des divisions équivaut donc à 1 centième de millimètre. Le micromètre oculaire est un disque de verre, portant 5 millimètres divisés en cinquante parties égales. Ce disque se place sur le diaphragme médian de l'oculaire ; il y est à demeure, ou peut s'enlever à volonté.

La méthode la plus facile et la plus expéditive consiste à déterminer, une fois pour toutes, le pouvoir amplifiant de la série d'objectifs dont on se sert. Pour ce faire, on installe le micromètre objectif sur la platine du microscope et l'on met au point, avec un objectif donné et l'oculaire micrométrique. On voit nettement l'image des deux échelles. En les faisant coïncider, on calcule la valeur d'une division du micromètre oculaire exprimée en centièmes de millimètre, pour l'objectif dont on s'est servi. On note cette quantité et l'on fait de même pour les autres objectifs. En dressant un tableau de ces différents résultats, il est facile d'arriver à une mensuration quelconque. On notera la valeur en divisions du micromètre oculaire et il suffira de multiplier ce chiffre par le pouvoir amplifiant de l'objectif porté sur le tableau. Le tube du microscope doit avoir naturellement une longueur identique dans les deux cas.

Voici un exemple, pour mieux indiquer la marche à suivre. Nous voulons déterminer les dimensions d'un objet vu à l'aide d'un objectif avec lequel il faut cinq divisions du micromètre oculaire pour recouvrir une division du micromètre objectif : chacune des cinq divisions vaut

(1) Cotton et Mouton, Les ultramicroscopes. Les objets ultramicroscopiques. Paris, Masson, 1906.

(2) Gastou, L'ultramicroscope dans le diagnostic clinique et les recherches de laboratoire. Paris, J.-B. Baillière et fils, 1910.

donc, à ce grossissement, 1 centième de millimètre divisé par 5, ou 2 millièmes de millimètre, 2 μ. S'il nous faut 3 divisions 1/2 du micromètre oculaire pour recouvrir l'objet en longueur, sa longueur sera $3\ 1/2 \times 2\,\mu = 7\,\mu$. De même pour la largeur.

Ce grossissement n'est pas un chiffre rigoureusement absolu ; il dépend en effet du grossissement de l'oculaire, qui varie, dans des limites restreintes, pour chaque œil qui regarde et aussi pour le même observateur, suivant l'âge et l'état de repos ou de fatigue de l'organe. Aussi est-il à recommander, sur un dessin par exemple, d'indiquer les systèmes objectif et oculaire employés.

Dessin.

Le dessin des objets vus au microscope, outre qu'il oblige à les étudier d'une manière beaucoup plus complète et approfondie, a le grand avantage de fixer, d'une façon durable, bien des détails de structure, bien des particularités de développement, qui, au bout d'un temps plus ou moins long, échapperaient forcément à la mémoire la mieux douée. Il faut donc s'y astreindre dès le commencement et se contenter même d'esquisses très simples, à défaut d'œuvres plus achevées.

Les dessins faits à simple vue ne suffisent pas, lorsqu'il est nécessaire d'en avoir de précis. Les proportions et les rapports exacts sont trop difficiles à garder. Il faut recourir aux appareils connus sous le nom de *chambres claires*. On en trouve la description dans les catalogues des constructeurs et dans tous les Traités de microscopie, où l'on en apprendra l'emploi. La distance où l'on place la feuille de papier, sur laquelle se projette l'image, fait varier très notablement l'amplification de celle-ci. Lorsqu'on dessine à la hauteur de la platine du microscope ou, à plus forte raison, sur la table de travail, l'image est agrandie et, ce qui est plus grave, légèrement déformée. Il sera souvent plus avantageux de rapprocher la feuille de papier de l'oculaire jusqu'à ce que l'image que projette sur elle le prisme de la chambre claire soit égale en grandeur à celle vue dans l'oculaire lui-même. Cette dernière distance varie naturellement avec l'objectif employé et avec l'œil de l'observateur. Elle est d'autant plus petite que l'objectif est plus faible. On peut se servir d'un pupitre qu'on élève ou abaisse à volonté, ou, plus simplement, d'une pile de livres plus ou moins haute qui supporte une tablette sur laquelle on dessine.

Il est toujours difficile et souvent impossible d'achever un dessin à la chambre claire. Quelques soins qu'on prenne, on obtient des traits tremblés, des formes incomplètes. Lorsque l'esquisse est minutieusement faite à la chambre claire, que tous les détails importants sont notés, on finit le dessin à la main levée, en regardant de l'œil gauche au microscope.

Il faut toujours noter, sur un dessin, le grossissement sous lequel il a été exécuté : grossissement 550, ou 550/1. On peut se contenter de marquer les numéros des systèmes optiques employés et le nom du constructeur : grossissement objectif 9, oculaire 2 (Vérick). — Obj. apochr. 1,30, oc. comp. 8 (Zeiss).

Photographie.

Ce mode de reproduction des images donne, en bactériologie, des résultats exceptionnels. L'exactitude rigoureuse de la reproduction des formes et des dimensions doit faire préférer les photographies aux meilleurs dessins. De plus, celles-là possèdent des caractères d'authenticité que ne présenteront jamais les derniers. Les photographies peuvent avoir une valeur à peu de chose près égale à la préparation elle-même.

La photographie sera tout particulièrement avantageuse pour la représentation, en grandeur naturelle ou à faible grossissement, des colonies, d'aspect souvent caractéristique, que les Bactéries donnent sur divers milieux de culture. C'est assurément le meilleur moyen de rendre les formes, si compliquées souvent, des colonies des cultures sur plaques de gélatine préparées d'après la méthode de Koch. Il serait difficile ou presque impossible de représenter par le dessin, dans toute leur exactitude, les détails très fins de certaines colonies, détails qui sont parfois destinés à entrer, pour une grande part, dans la diagnose de l'espèce. Il en est de même pour les cultures en tubes, d'aspect très caractéristique pour beaucoup d'espèces.

La reproduction de préparations à de forts grossissements à sec ou à immersion demande un outillage perfectionné et des soins plus minutieux, devant porter sur l'éclairage et sur la mise au point.

La photographie n'est pas seulement, pour l'étude des Bactéries, un excellent moyen de reproduction offrant des garanties que n'ont jamais les dessins : elle s'élève à la hauteur d'une méthode de recherches de premier ordre qui, en des mains habiles, a déjà donné des résultats des plus précieux. La plaque sensible se laisse impressionner par des détails invisibles à l'œil, parce que l'objectif photographique peut utiliser des rayons lumineux de longueur d'onde trois fois plus petite que ceux que peut utiliser l'œil. Un cliché photographique pourra donc montrer des détails que l'observateur n'arrivera jamais à distinguer dans la préparation, malgré l'attention la plus soutenue. Il suffit de dire que c'est sur des clichés, ou des épreuves positives obtenues avec eux, que Koch a découvert les cils vibratiles de plusieurs espèces de Bactéries mobiles. On trouvera dans un beau mémoire de ce savant (1) d'exactes reproductions photographiques des cils vibratiles du *Spirillum undula* et d'un Bacille, qui est probablement le *Bacillus subtilis*.

Nous renvoyons aux ouvrages spéciaux pour tous les détails (Voy. Albert Londe, *Aide-mémoire de photographie*, Paris). La pratique générale s'apprendra dans les Traités ordinaires de photographie ; ou, mieux, en se faisant guider quelque temps par un bon photographe, artiste ou amateur. Quant aux méthodes particulières à la photomicrographie, elles sont exposées et discutées magistralement dans les traités de Moitessier (2), Huberson (3), Viallanes (4), de Neuhauss (5),

(1) Koch, Untersuchungen über Bacterien (*Cohn's Beitr. zür Biol. der Pflanzen*, II, 1877, p. 399, et pl. XIV, XV et XVI).

(2) Moitessier, La photographie appliquée aux recherches microscopiques. Paris. J.-B. Baillière, 1866.

(3) Huberson, Précis de microphotographie. Paris, 1879.

(4) Viallanes, La photographie appliquée aux études d'anatomie microscopique. Paris, 1886.

(5) Neuhauss, Lehrbuch der Mikrophotographie. Braunschweig, Harald Brun, 1890.

Choquet (1), etc. Plusieurs mémoires contiennent des renseignements plus particuliers aux Bactéries. On consultera avec fruit plusieurs travaux de Koch (2). Un excellent article de Roux (3) renferme, à côté de conseils très pratiques, une série de photomicrographies vraiment remarquables. L'*Atlas* de Crookshank (4) contient une collection bien réussie de quatre-vingt-six photographies représentant des espèces intéressantes. L'*Atlas* de Fraenkel et Pfeiffer (5) montre au mieux les excellents résultats qu'on peut retirer de ces procédés de reproduction; celui de Itzerott et Niemann (6), moins complet, renferme cependant pas mal de figures intéressantes. Les photographies de Zettnow, dans l'ouvrage de Kolle et Wassermann (7), sont de véritables modèles. De nombreuses autres publications similaires démontrent la grande valeur de la méthode.

N'importe quel appareil de photographie, que l'on peut relier d'une manière convenable à un bon microscope, permet d'obtenir de très bons résultats; néanmoins, il est toujours plus commode de recourir aux appareils imaginés spécialement pour le but que l'on vise.

Depuis ces dernières années, les appareils de photographie microscopique ont reçu des perfectionnements très importants. La figure 51 représente le grand modèle que construit Vérick. La disposition horizontale de la chambre noire est très commode pour l'éclairage et la mise au point sur la glace dépolie. Elle ne peut malheureusement pas servir pour la photographie des cultures sur plaques, où la liquéfaction de la gélatine, qu'occasionnent beaucoup d'espèces, empêche de disposer la plaque verticalement. Il faut alors faire modifier légèrement l'appareil pour pouvoir le placer verticalement. Zeiss fabrique un appareil plus perfectionné encore (fig. 52), mais d'un prix beaucoup plus élevé. Les petits appareils verticaux, plus simples, comme celui représenté fig. 53 et 54, sont tout à fait à recommander.

On enlève souvent l'oculaire; lorsqu'on veut s'en servir, on doit prendre des oculaires spéciaux, dits *achromatiques* ou *orthoscopiques*.

Zeiss construit, sous le nom d'*oculaires à projection*, des oculaires spécialement destinés à projeter l'image donnée par l'objectif sur un écran ou sur une plaque sensible. Le système optique est soigneusement corrigé au point de vue des aberrations de couleur et de sphéricité. On obtient d'excellents résultats pour la microphotographie, en les combinant avec les objectifs apochromatiques du même constructeur.

La question de l'éclairage est une des principales. Pour les faibles grossissements, on peut se contenter de la lumière diffuse du jour ou de celle fournie par les lampes à pétrole ou à gaz bec Auer. Il faut avoir

(1) Choquet, La photomicrographie histologique et bactériologique. Paris, Ch. Mendel.

(2) Koch, Mémoire précité et : Zur Untersuchungen von pathogenen Organismen (*Mitth. aus dem kaiserl. Gesundheitsamte*, I, 1881).

(3) Roux, La photographie appliquée à l'étude des microbes (*Ann. de l'Inst. Pasteur*, I, 1887, p. 206).

(4) Crookshank, Photography of Bacteria. London, Lewis, 1887.

(5) Fraenkel u. Pfeiffer, Mikrographischer Atlas der Bakterienkunde. Berlin, Hirschwald, 1889-1891.

(6) Itzerott u. Niemann, Mikrophotographischer Atlas der Bakterienkunde. Leipzig, J. A. Barth, 1895; trad. française par S. Bernheim. Paris, Maloine, 1895.

(7) Kolle u. Wassermann, Handbuch der pathogenen Mikroorganismen. Atlas photographischer Tafeln nach Originalaufnahmen von E. Zettnow. Iena, Fischer, 1920.

recours, pour photographier avec de forts objectifs, à des sources lumineuses d'intensité plus grande. On peut user de la lumière solaire, qui nécessite alors l'emploi d'un *héliostat*, à cause du déplacement apparent du soleil, très sensible dans les poses un peu longues. La lumière oxycalcique ou oxymagnésienne, ou l'éclairage électrique, sont beaucoup plus faciles à régler et d'un usage plus constant, surtout dans nos régions où le soleil est souvent rare; à leur défaut, on peut user de très fortes lampes à pétrole, ou d'un bec Auer, ce qui nécessite alors un temps de pose très prolongé. Lorsqu'on emploie la lumière artificielle, il faut se rappeler qu'elle est moins riche en rayons chimiques que la lumière solaire, que, par conséquent, le temps de pose doit être augmenté. L'expérience apprendra mieux que toutes les explications la différence qu'il faut y mettre. Pour déterminer le temps de pose, on peut

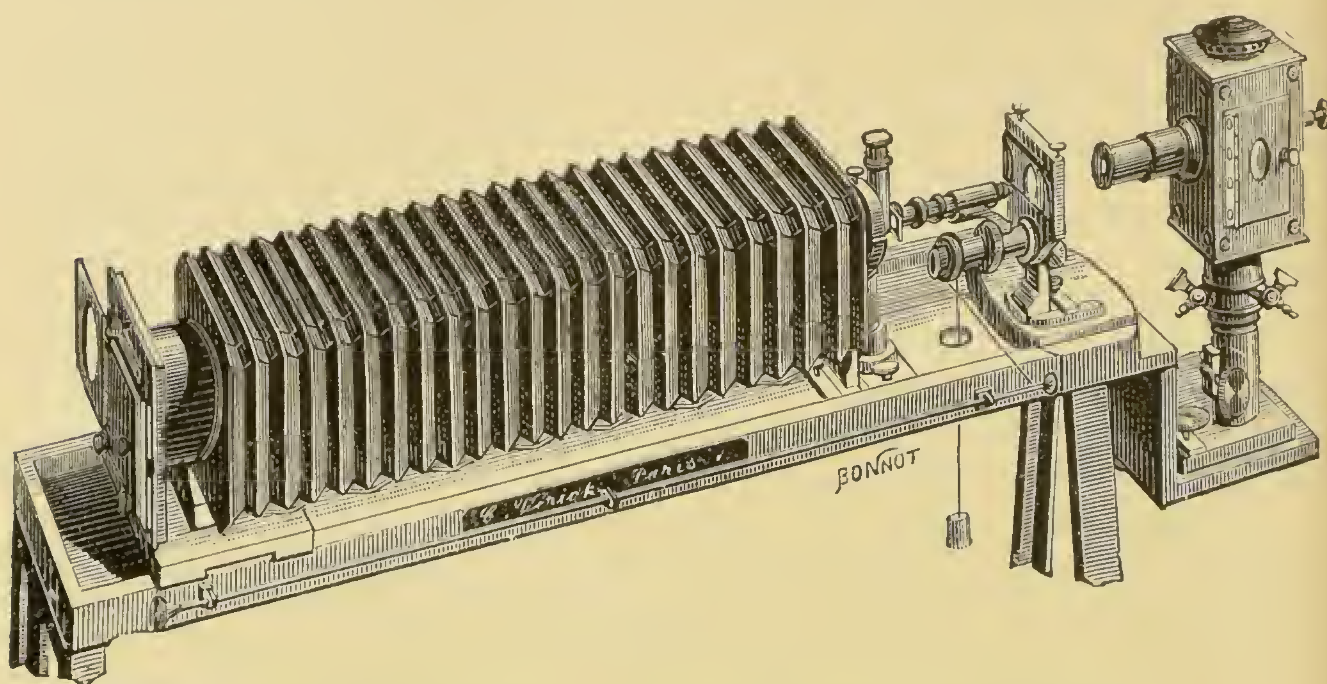


Fig. 51. — Appareil de photographie microscopique (Vérick).

avantageusement se servir de l'un des photomètres actuellement en usage, de l'appareil Decoudun, par exemple.

C'est également la pratique qui fera connaître les usages si importants du condenseur et des diaphragmes. Toutefois, il paraît préférable de mettre le condenseur plus près de la préparation et d'user de diaphragmes plus petits.

La lumière oblique pourra être très utile, principalement dans la photographie des colonies sur plaques de gélatine ou en tubes. Il faut, ici, s'arranger de façon à bien faire valoir les reliefs de la colonie. Pour les cultures en tubes, on doit, en plaçant convenablement la source lumineuse et en s'aidant d'écrans, faire disparaître le plus possible les reflets qui se produisent sur la surface convexe du verre ; ils nuisent à la netteté de la photographie et ne permettent pas d'avoir une image complète. Il vaut encore mieux, lorsque les cultures s'y prêtent, photographier les objets immergés dans l'eau ; on éteint ainsi tous les reflets. Dans ce dernier cas, il faut naturellement employer un appareil vertical.

Il serait très intéressant de pouvoir photographier des Bactéries en vie, dans le liquide où elles se développent. La chose est rarement

possible. Pour les espèces mobiles, il n'y a pas à y songer. Les autres sont presque toujours animées de trépidation brownienne, qui suffit à donner des images complètement troubles. Enfin la transparence est en général si grande que les contours sont trop peu nets, sur

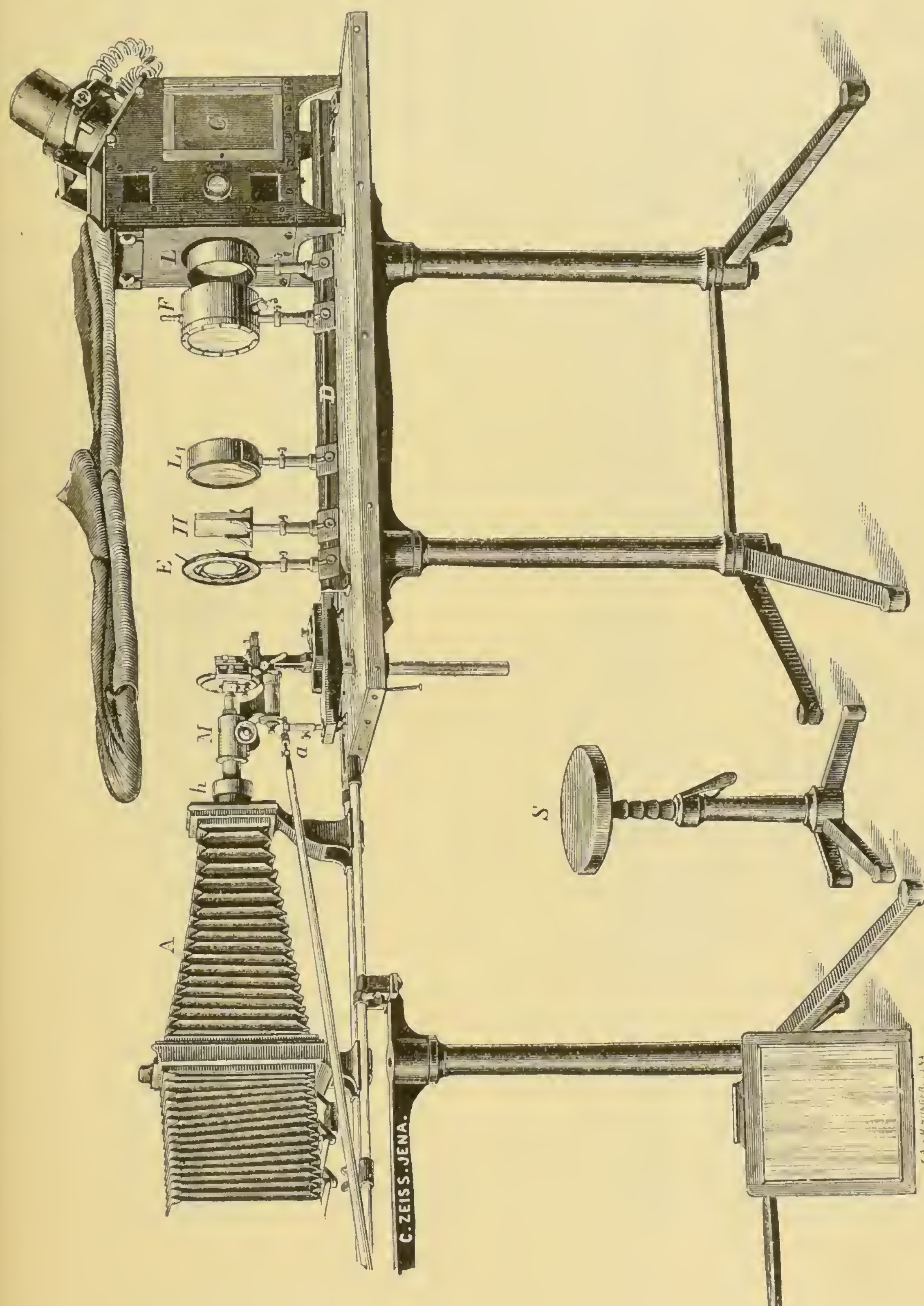


Fig. 52. — Grand appareil microphotographique (Zeiss).

les fonds éclairés, pour donner une bonne photographie. C'est un côté de la question à étudier, qui pourrait donner de précieuses indications.

La plupart du temps on a donc recours aux préparations colorées. Les couleurs d'aniline rouges, bleues et violettes, dont on se sert de préférence, venant mal en photographie, Koch recommandait l'emploi

de bruns ou particulièrement de vésuvine ou brun Bismarck. Depuis, l'invention des plaques *isochromatiques*, *orthochromatiques*, *panchromatiques*, sensibles à toutes les radiations, permettant de rendre les nuances bleue, violette et rouge, avec leur intensité propre, a considérablement facilité la photographie des Bactéries traitées par les diverses méthodes de coloration. Le développement de ces plaques se fait d'après les procédés ordinaires ; le temps de pose est égal à celui des autres. Viallanes recommande

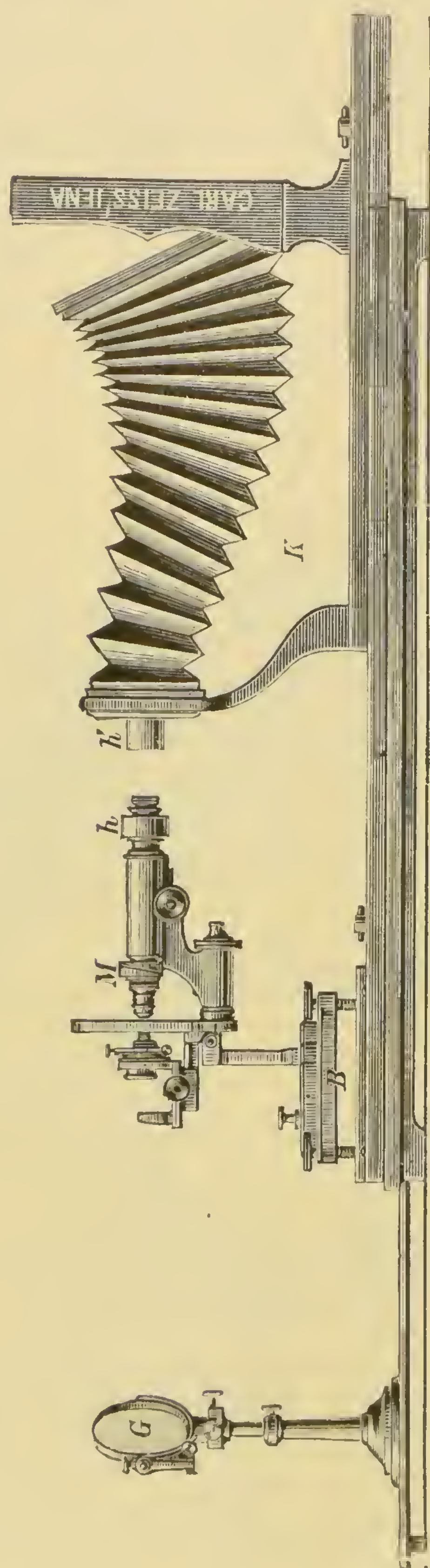


Fig. 53. — Petit appareil photographique horizontal (Zeiss).

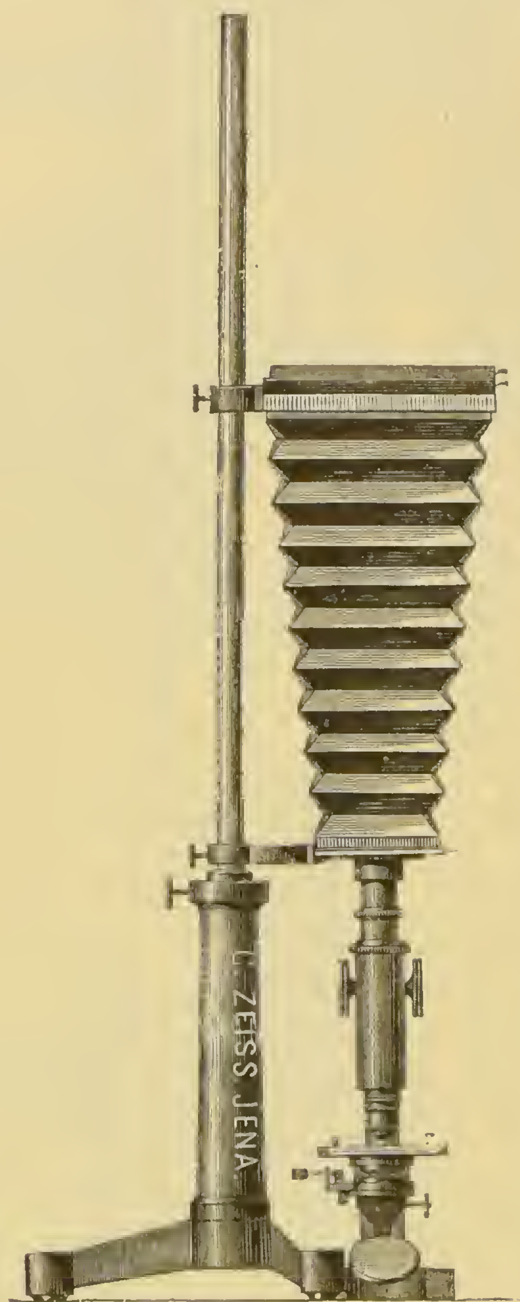


Fig. 54. — Petit appareil photographique vertical (Zeiss).

de combiner leur emploi avec celui de la lumière monochromatique jaune que l'on obtient facilement en interposant, entre la source lumineuse et la préparation, une lame de verre jaune ou une petite cuve, à faces planes et parallèles, remplie d'une solution saturée d'acide picrique.

A côté des reproductions photographiques, comme à côté des dessins,

il est nécessaire de faire figurer l'indication exacte du grossissement. On le fait comme pour les dessins, ou, mieux, d'après l'excellente méthode de Roux, en plaçant, à côté des épreuves positives, une photographie du micromètre objectif, obtenue avec la même composition optique et le même tirage de chambre noire.

En agrandissant les clichés obtenus, on arrive à avoir des images considérablement grossies. Malheureusement, bien des détails se perdent dans ces manipulations : on perd en netteté beaucoup plus qu'on ne gagne en grosseur. On s'en rendra facilement compte en examinant l'*Atlas* de Crookshank, dont nous avons parlé plus haut.

Les procédés actuels de phototypie permettent de reproduire d'une façon très convenable les épreuves obtenues. La photographie industrielle, d'un autre côté, livre aujourd'hui de nombreuses épreuves à très bon compte ; ces tirages directs perdent moins dans les détails.

Les méthodes actuelles de *photographie en couleurs* permettent d'obtenir de très belles épreuves de préparations colorées, convenant surtout pour la projection.

On peut recommander les plaques Lumière, les plaques omnicolores de Joucla, les Diopticron de Dufay (Maison Guilleminot).

Les procédés de *cinématographie* enregistrent les mouvements des espèces mobiles en vie et permettent de les projeter d'une manière fort intéressante ; avec les Spirilles et les Spirochètes, on peut obtenir d'excellents résultats.

2° Appareils de chauffage.

A côté du microscope, instrument indispensable, se placent les appareils de chauffage à une température élevée ou à une température moyenne et fixe (1).

Les premiers sont destinés à porter à une haute température, soit dans l'air sec, soit dans la vapeur d'eau, les ustensiles et les substances à employer, de façon à tuer les germes qu'ils pourraient renfermer, à les *stériliser*.

Les autres doivent maintenir, à une température moyenne mais fixe, au moyen d'un chauffage continu et réglé, les milieux où l'on fait vivre les Bactéries.

Le mode de chauffage le plus commode est sans contredit le gaz. On peut cependant le remplacer par tout autre combustible, charbon ou pétrole par exemple, voire électricité ; on peut, de même, utiliser, au lieu et place d'étuves à température fixe, les différents modèles de couveuses artificielles, à simple manchon d'eau chaude ou à feu continu.

Appareils à stérilisation à air sec.

Le plus simple est une petite étuve, en tôle ou en cuivre rivés,

(1) Parmi les maisons qui fabriquent tous ces appareils pour les laboratoires de bactériologie, on doit surtout citer les suivantes : Wiesnegg, Lequeux successeur, 84, rue Gay-Lussac, Paris ; Adnet, 26, rue Vauquelin, Paris : Lautenschläger, 54, Oranienburgerstrasse, Berlin : R. Muenke, 58, Luisenstrasse, Berlin ; P. Altmann, 47, Luisenstrasse, Berlin ; Hearson et C°, 235, Regent Street, Londres. Les catalogues sont généralement envoyés sur demande.

de forme carrée ou rectangulaire, dont un des côtés fait porte (fig. 55).

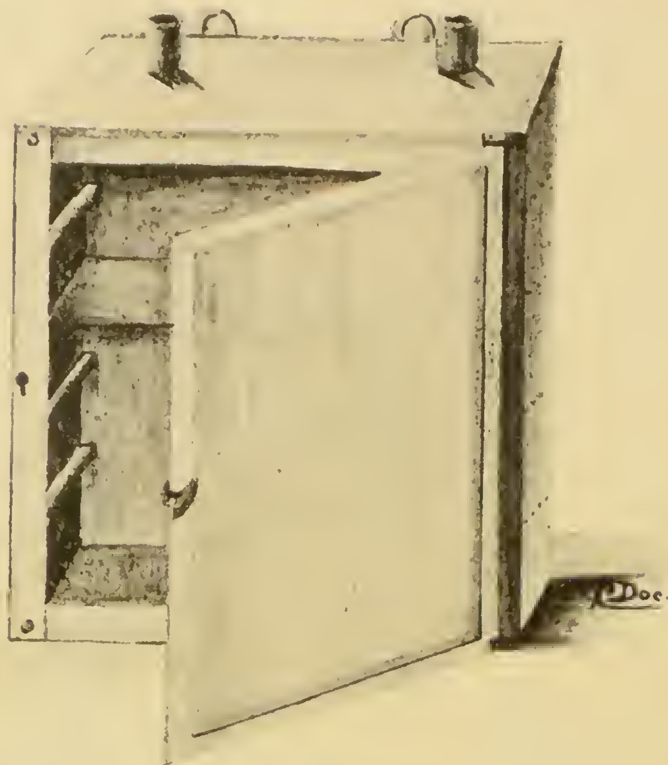


Fig. 55. — Appareil à stérilisation à air sec.

Les dimensions de 30 centimètres de hauteur sur 20 centimètres de largeur et de profondeur suffisent amplement. L'appareil peut être rapidement porté à une température de 150° environ,

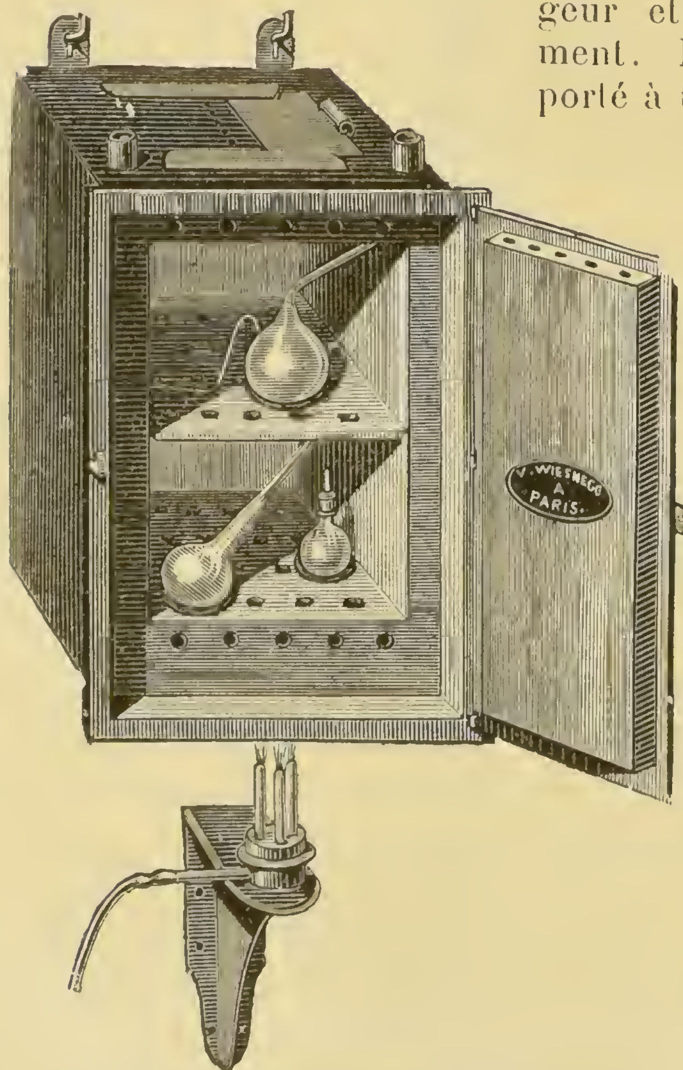


Fig. 56. — Stérilisateur à air chaud.

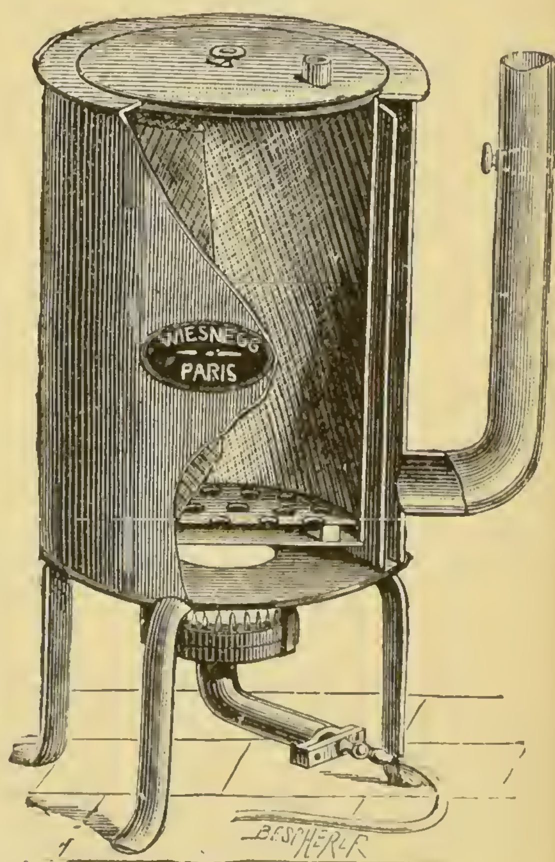


Fig. 57. — Four de Pasteur pour flamber les ballons.

au moyen d'un fort bec à couronnement. Ces étuves se fabriquent fa-

cilement partout. Les constructeurs en vendent à doubles parois, dans lesquelles la chaleur se répartit bien plus uniformément et se maintient plus régulière (fig. 56); mais ici de légères variations n'ont aucune importance. Le stérilisateur à air chaud est un des instruments le plus couramment employés : il sert journellement à porter à une haute température, de 150° à 180°, la verrerie, les scalpels, pinces, ciseaux, la ouate, etc.

Le même résultat s'obtient avec le *four à flamber* de Pasteur construit par la maison Lequeux (fig. 57). C'est un fourneau en tôle, chauffé extérieurement par un fort brûleur, dans lequel on peut suspendre un panier en toile métallique, contenant les différents objets à soumettre à la haute température.

Il n'est pas nécessaire d'adapter des régulateurs à ces appareils où les variations de température ne sont pas nuisibles, pourvu que le degré reste assez élevé. Cependant l'emploi d'un régulateur est toujours avantageux; on peut user d'un régulateur à mercure tel que ceux dont il sera parlé plus loin, réglé à 180°, par exemple. Il est toujours prudent de s'assurer de la température, à l'aide d'un thermomètre fixé dans un orifice spécial que doivent présenter ces instruments dans leur partie supérieure.

On peut se servir, pour apprécier le degré de chauffe d'un de ces stérilisateurs, d'un tampon d'ouate qu'on place à côté des objets à stériliser. La chaleur doit être poussée jusqu'à ce que la ouate roussisse légèrement, ce qui indique une température de 170° environ.

Les objets doivent y séjourner d'une demi-heure à trois quarts d'heure.

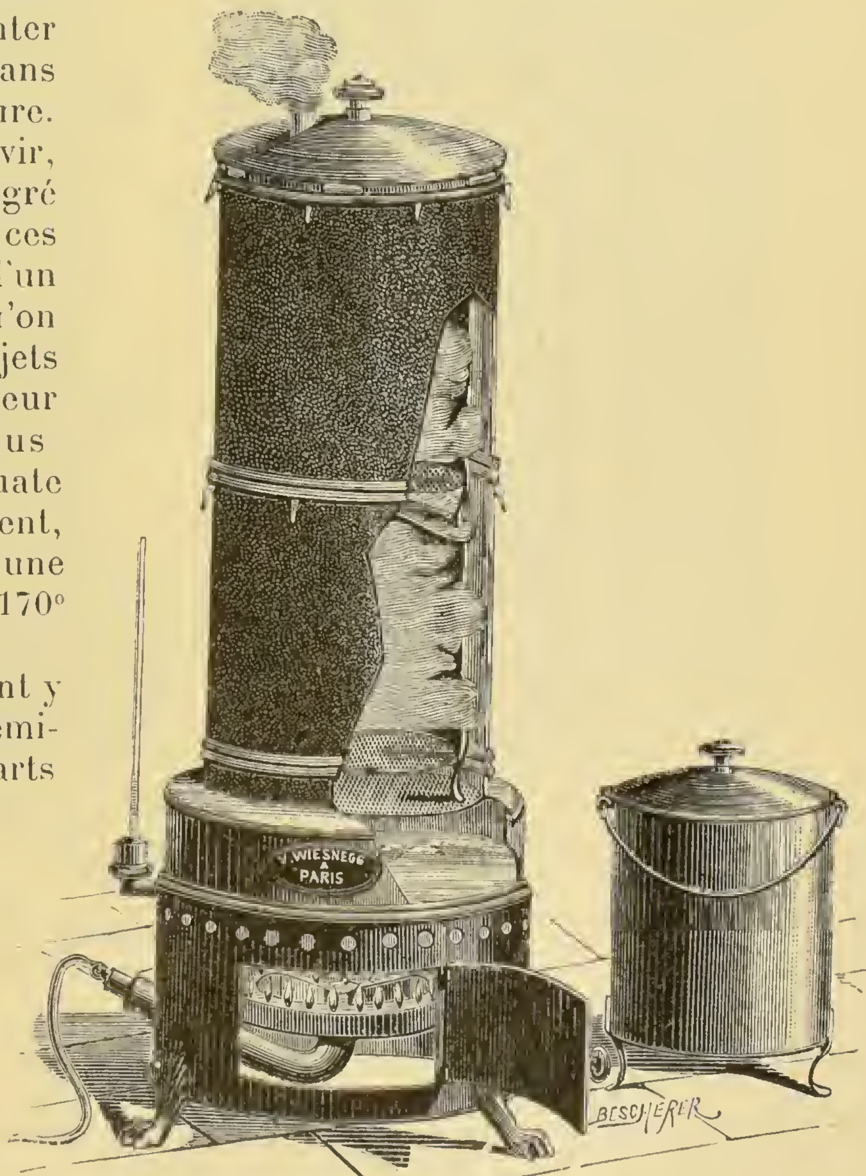


Fig. 58. — Stérilisateur à vapeur de Koch.

Appareils à stérilisation à vapeur.

Les objets sont maintenus dans une atmosphère de vapeur d'eau, fournie par une masse de liquide placée à la partie inférieure de l'appareil. Cette vapeur peut se trouver à la pression normale ; un thermomètre

placé dans son intérieur marque alors exactement 100°. Ou bien elle peut se dégager sous pression ; sa température est alors d'autant plus élevée que la pression est plus forte.

Le type des appareils de la première catégorie est le *stérilisateur à vapeur* de Koch (fig. 58). C'est un cylindre en fer-blanc, recouvert d'une couche épaisse de feutre dont la partie inférieure, qui est fermée par un grillage, est soudée à une petite chaudière en cuivre rouge pouvant contenir 2 à 3 litres d'eau. La chaudière est munie latéralement

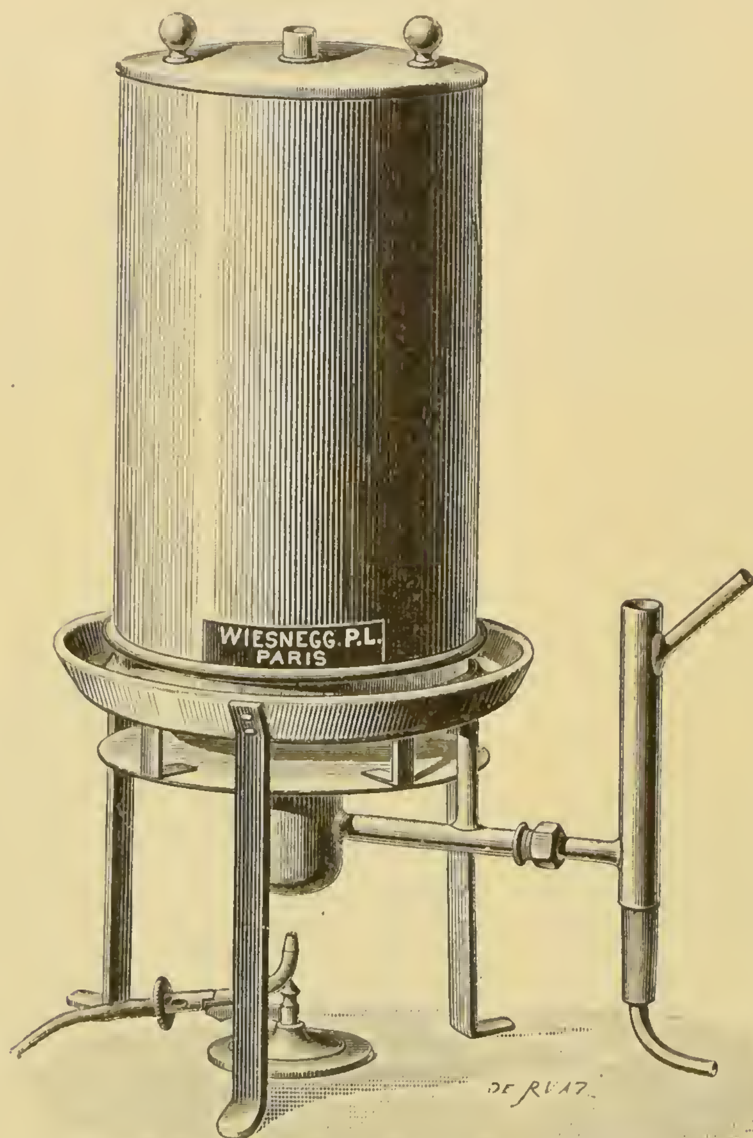


Fig. 59. — Stérilisateur à vapeur fluente à 100°.

d'un tube à niveau, indiquant la hauteur de l'eau dans son intérieur. Le cylindre en fer-blanc se ferme supérieurement par un couvercle, muni d'une tubulure pour le thermomètre et portant trois arrêts qui l'empêchent d'obturer hermétiquement l'orifice. On dispose les objets à l'intérieur dans un panier en treillis. La chaudière est chauffée avec un fort bec à couronnement ou avec une couronne de petits becs brûlant à bleu, qui mettent rapidement l'eau en ébullition. Le cylindre se remplit de vapeur d'eau, qui garde la pression normale, grâce aux interstices du couvercle par où elle peut se dégager. L'enveloppe de feutre empêche le refroidissement. Aussi le thermomètre, qui marque 100° dès que la vapeur sort du pourtour du couvercle, reste-t-il fixe à cette température tant que dure l'ébullition. On verse de l'eau dans la chaudière jusqu'à 1 ou 2 centimètres du grillage qui sépare la chaudière du

cylindre. Cette quantité est suffisante pour fournir de la vapeur pendant le temps que doit marcher l'appareil, une heure et demie à deux heures en moyenne. On suit du reste l'abaissement du niveau du liquide à l'aide du tube latéral. Il ne faut jamais, naturellement, laisser la chaudière chauffer à sec.

La figure 56 représente un autre type de stérilisateur à vapeur à 100°, avec niveau constant. La quantité d'eau à chauffer, bien moindre que

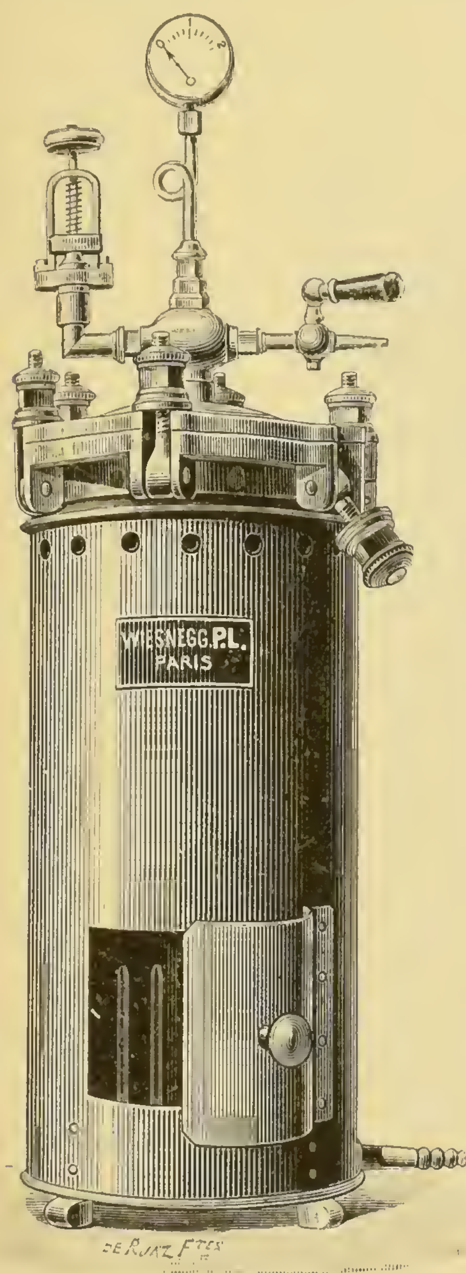


Fig. 60. — Autoclave de Chamberland.

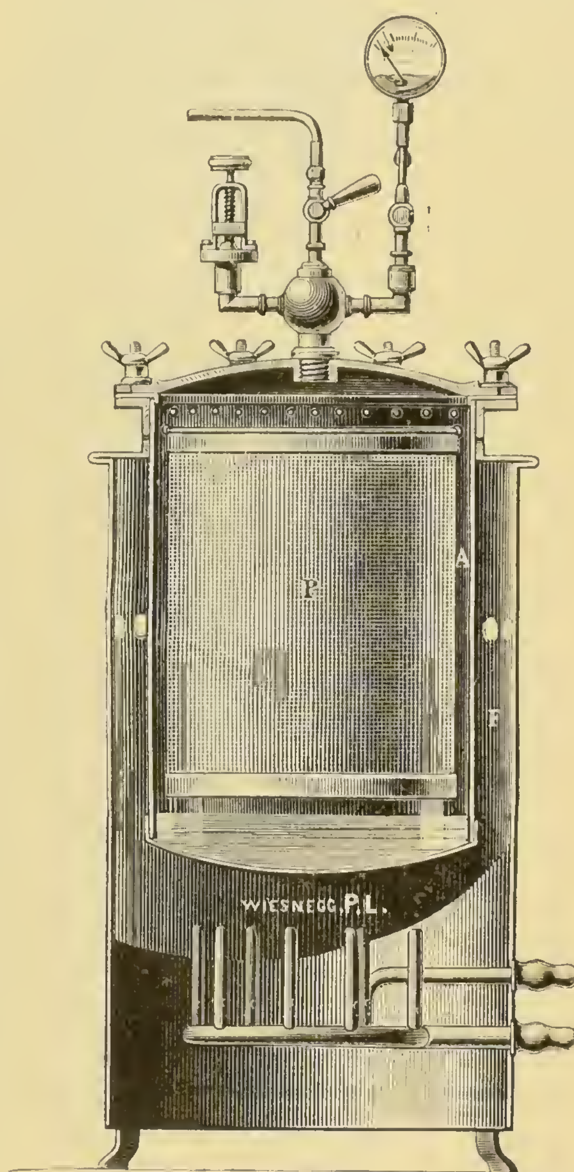


Fig. 61. — Autoclave de Chamberland.

dans le modèle précédent, permet d'opérer plus rapidement et avec moins de dépense, au moyen d'un seul bec.

Le plus usité des appareils à stérilisation à l'aide de la vapeur d'eau *sous pression* est l'*autoclave* de Chamberland (fig. 60 à 63). C'est une marmite de Papin perfectionnée. Il se compose d'une chaudière en cuivre rouge brasé, sur laquelle se fixe, à l'aide de fortes vis de pression, un couvercle en cuivre massif muni de trois orifices. L'un des orifices donne issue au tube d'un manomètre ; un second est muni d'un robinet ; le troisième porte une soupape de sûreté. La chaudière est supportée par un fourneau à enveloppe de tôle, muni de deux couronnes

de forts brûleurs. Le manomètre est gradué de 0 à 2 atmosphères et porte en regard des indications de pression les indications thermométriques correspondantes. L'appareil est des plus facile à mettre en marche. On dispose les objets à soumettre à la température voulue, 115° par exemple, dans un panier en toile métallique, qui se place dans la chaudière en laissant à la partie inférieure un espace vide. On verse

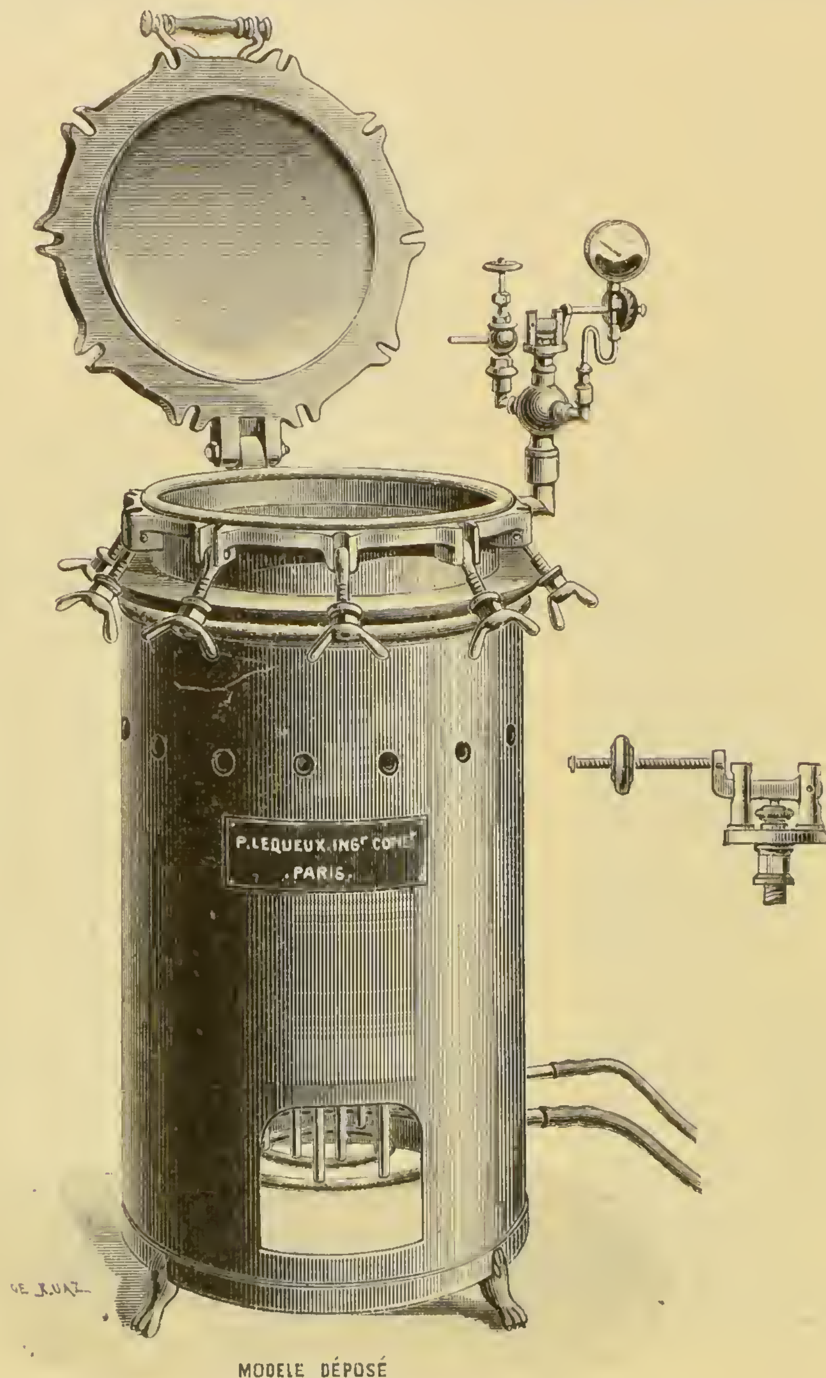


Fig. 62. — Autoclave de Chamberland, couvercle à charnière et soupape à poids.

de l'eau dans la chaudière presque jusqu'au niveau du fond du panier, on place celui-ci garni et l'on couvre. Pour obturer complètement l'interstice qui existe entre la chaudière et son couvercle, on interpose un boudin de caoutchouc et l'on serre modérément les vis de pression à l'aide d'une clef. On allume une ou deux couronnes du fourneau, et bientôt l'eau qui se trouve dans la partie inférieure de la chaudière entre en ébullition. Il est nécessaire d'ouvrir le robinet du couvercle dès qu'on allume, de façon à laisser échapper l'air qui pourrait nuire au bon fonctionnement ; cet air, en se dilatant, actionnerait le manomètre en même

temps que la vapeur, l'indication de température donnée par le manomètre ne serait pas exacte. Dès qu'il en sort un petit jet de vapeur, on le ferme. Il est alors très simple, en observant le manomètre, de régler à peu près l'autoclave à la température que l'on veut atteindre. On y arrive en diminuant la chauffe et avec la soupape de sûreté, en reculant ou en avançant le contrepoids selon que la température est trop élevée ou trop basse. Si la température montait trop, en ouvrant le robinet et en laissant partir une certaine quantité de vapeur, il est facile de la faire rapidement descendre.

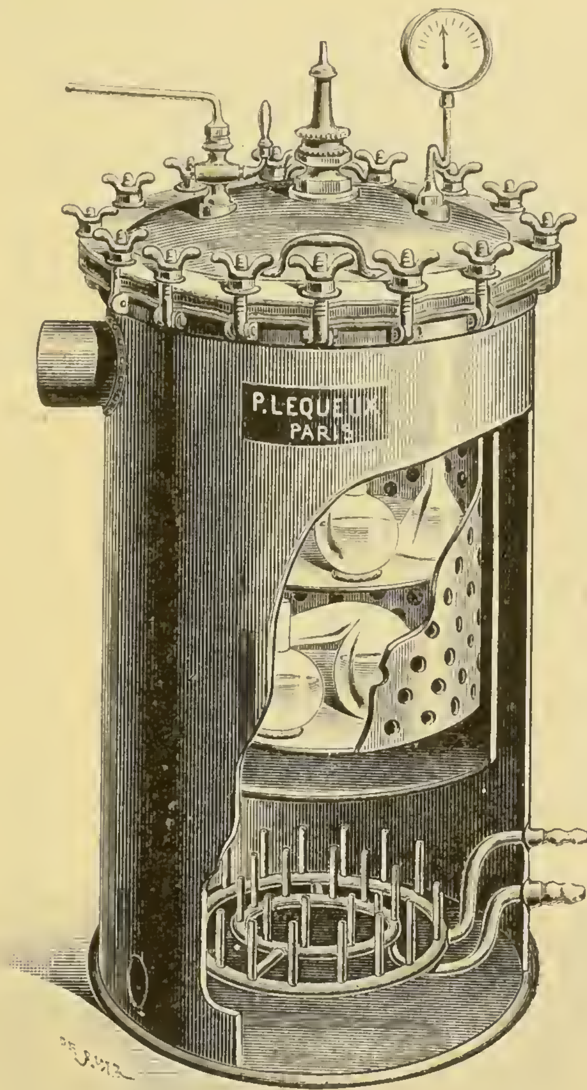


Fig. 63. — Autoclave de Chamberland.

Le modèle représenté figure 62 a son couvercle à charnières, présentant une commodité précieuse pour l'ouverture.

L'*autoclave Radais* (fig. 64, 65 et 66), monté sur un bâti mobile qui en permet le facile déplacement, a son départ de vapeur à la partie inférieure ; le tuyau de départ (FG, fig. 65) sert aussi à la vidange de l'eau et au nettoyage de la chaudière, opération bien plus facile alors qu'avec les autres modèles. L'ouverture et la fermeture du couvercle se font par le jeu très aisé d'une pédale C, dont l'usage se comprend bien à l'inspection des figures.

Il peut être très utile de connaître, pour l'usage de ces appareils à vapeur sous pression, les rapports qui existent entre la température et la pression. Ils sont exprimés dans le tableau suivant, établi par Dulong et Arago :

ATMOSPHÈRES.	TEMPÉRATURE.	ATMOSPHÈRES.	TEMPÉRATURE.
1	100°,0	8	172°,1
1,5	112°,2	9	177°,1
2	121°,4	10	181°,6
2,5	128°,8	11	186°,0
3	135°,1	12	190°,03
3,5	140°,6	13	193°,7
4	145°,4	14	197°,19
4,5	149°,6	15	200°,48
5	153°,08	16	203°,60
5,5	156°,8	17	206°,57
6	160°,2	18	209°,4
6,5	163°,48	19	212°,1
7	166°,5	20	214°,7
7,5	169°,37		

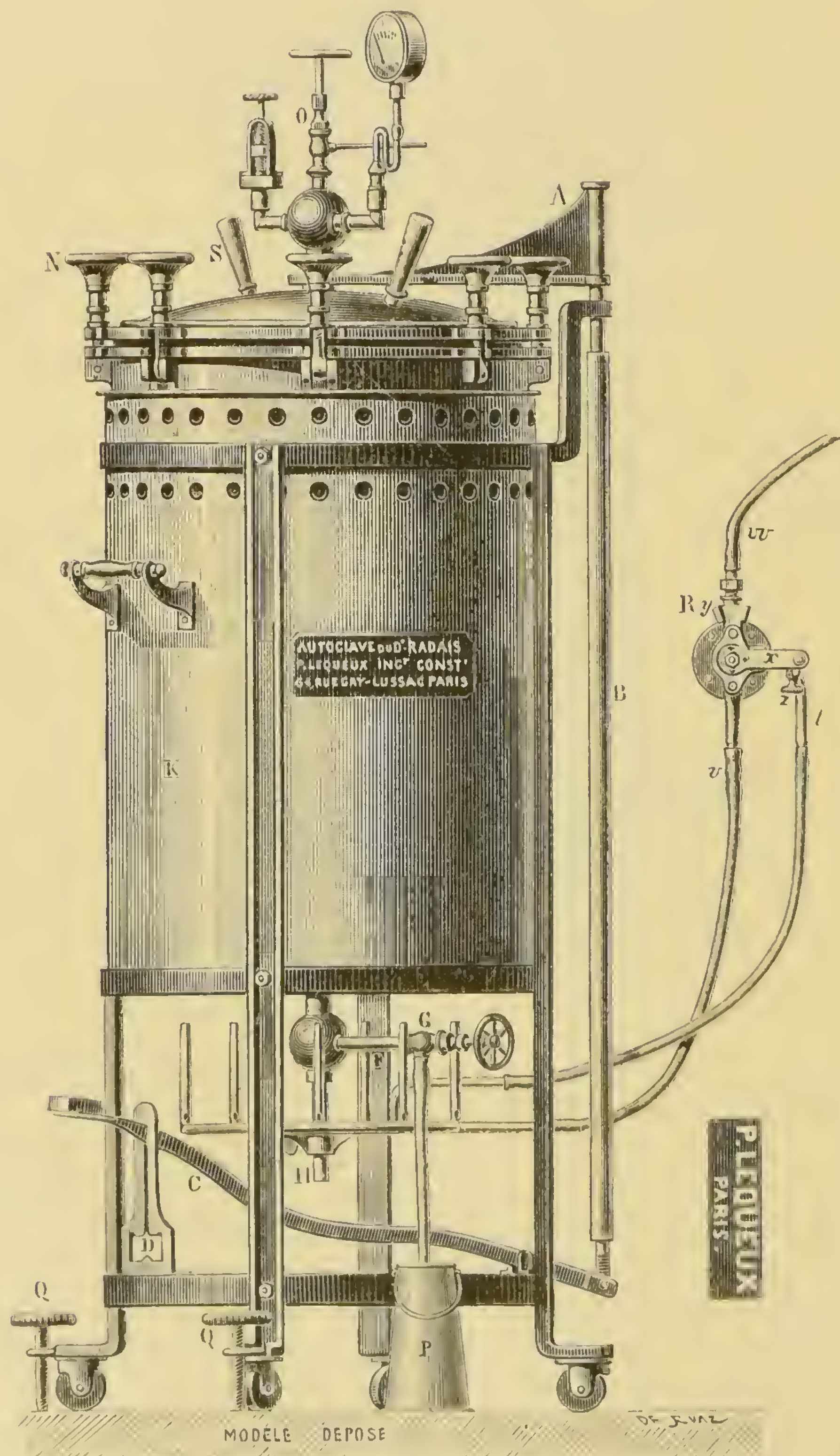


Fig. 64. — Autoclave du Dr Radais.

En laissant le robinet du couvercle ouvert, l'appareil fonctionne comme le stérilisateur de Koch. La température intérieure reste fixe à 100° sous pression normale.

Pour les grandes installations, l'autoclave vertical Vaillard et Besson

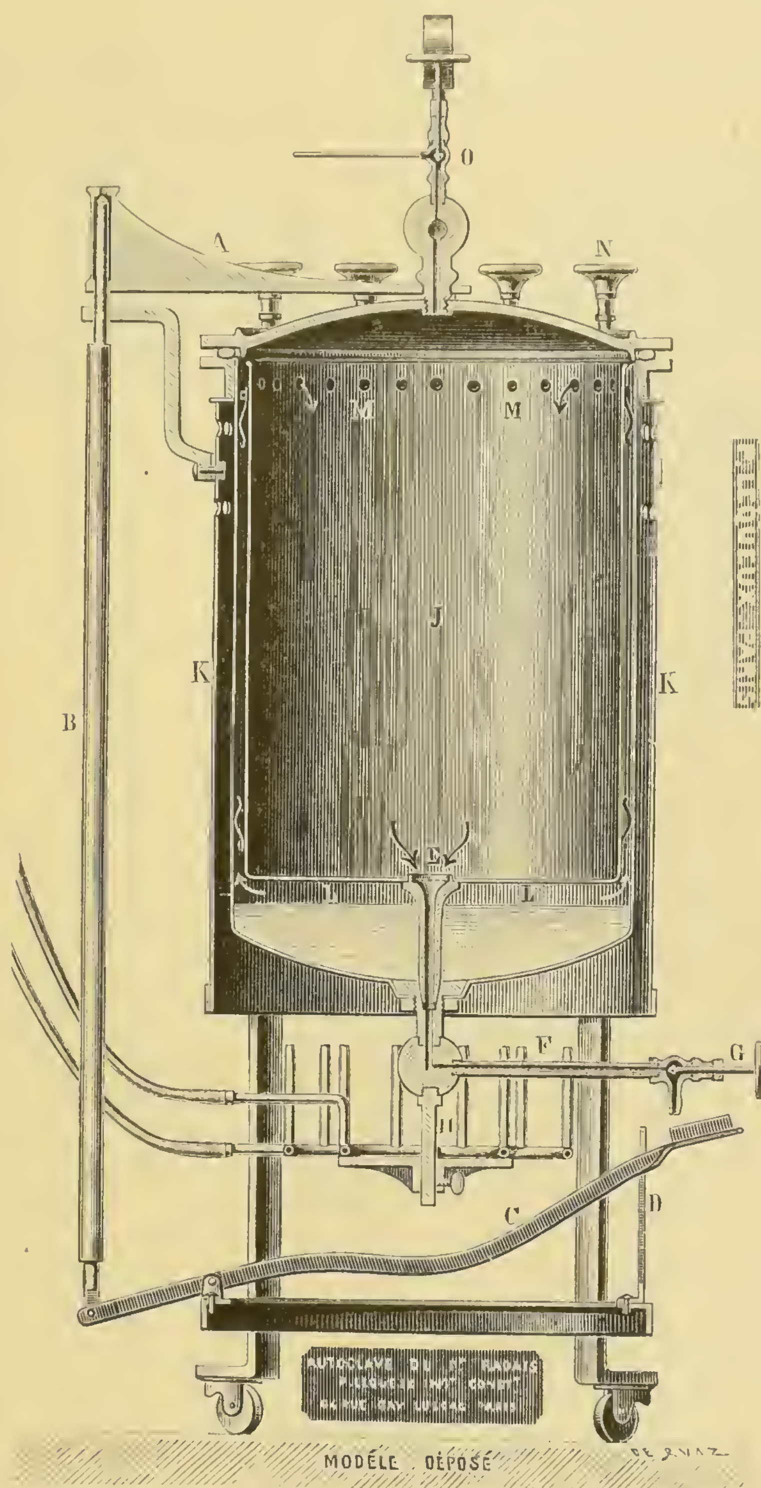


Fig. 65. — Autoclave du Dr Radais.

(Lequeux, constructeur) permet la stérilisation de fortes quantités de milieux de culture

Avec tous ces appareils, pour éviter la condensation de la vapeur, si gênante surtout avec la ouate hydrophile, qui peut alors par trop se mouiller, il est bon de recouvrir d'une feuille de papier à filtrer ou d'une toile très mince les objets soumis à l'action de la vapeur.

Comme appendice, en quelque sorte, nous devons placer ici les *bains-marie* ordinaires ou à température plus élevée.

Le *bain-marie* ordinaire est un des appareils les plus utiles et les plus employés. Les constructeurs en vendent en cuivre rouge brasé, munis de rondelles de différentes grosseurs. On peut sans inconvénients les remplacer par de simples marmites de toute taille et de forme que l'on

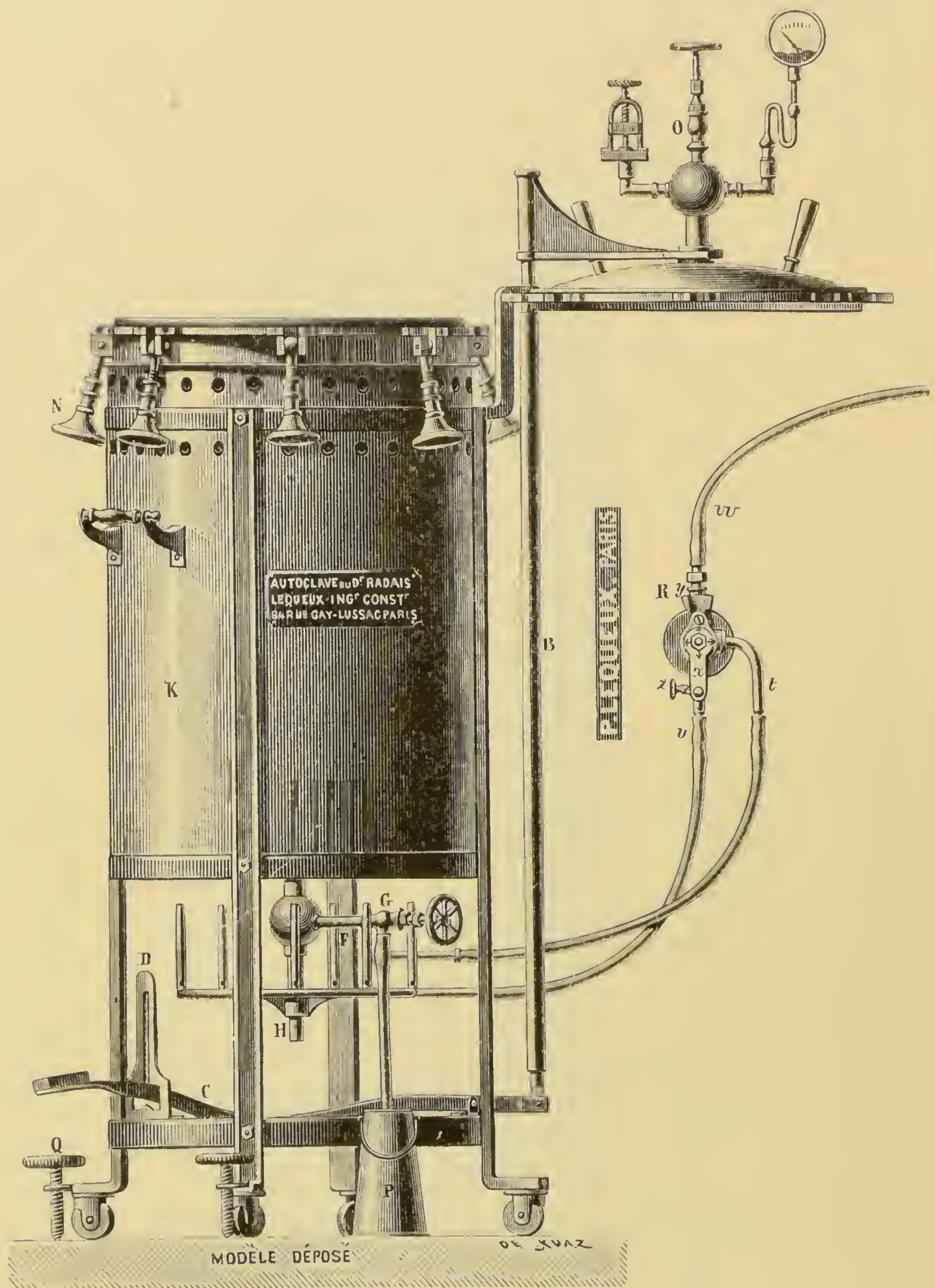


Fig. 66. — Autoclave du Dr Radais.

jugera convenable. Les objets qu'il faut immerger seront maintenus dans le liquide par des contrepoids ou des supports à pinces.

Pour obtenir des températures plus élevées, on se sert de bains d'huile ou de solutions salines. Avec des solutions saturées de divers sels, on obtient les températures suivantes :

Carbonate de soude	104°,6
Chlorure de sodium	109°,7
Azotate de potasse	115°,9
Carbonate de potasse	135°,0
Chlorure de calcium	179°,5

Les huiles grasses peuvent supporter une température de 250° sans s'altérer ; elles n'entrent en ébullition que notablement au-dessus.

Wiesnegg a construit, d'après les données de Pasteur, un bain-marie à chlorure de calcium (fig. 67). C'est une chaudière en cuivre rouge brasé, munie d'un support intérieur spécial, qui sert à fixer les ballons remplis de bouillon à stériliser, et les empêche de se heurter pendant l'ébullition. Des pertes nombreuses par accidents et l'emploi très limité de l'appareil lui font préférer ceux décrits précédemment.

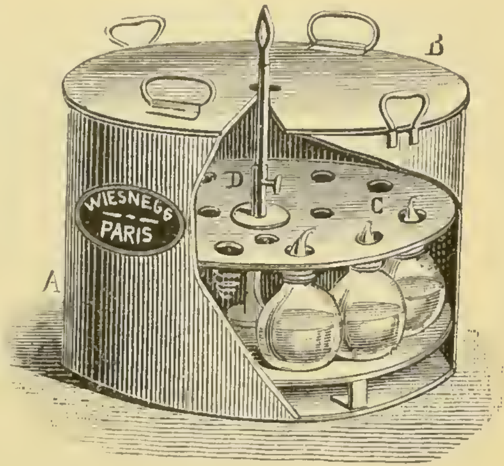
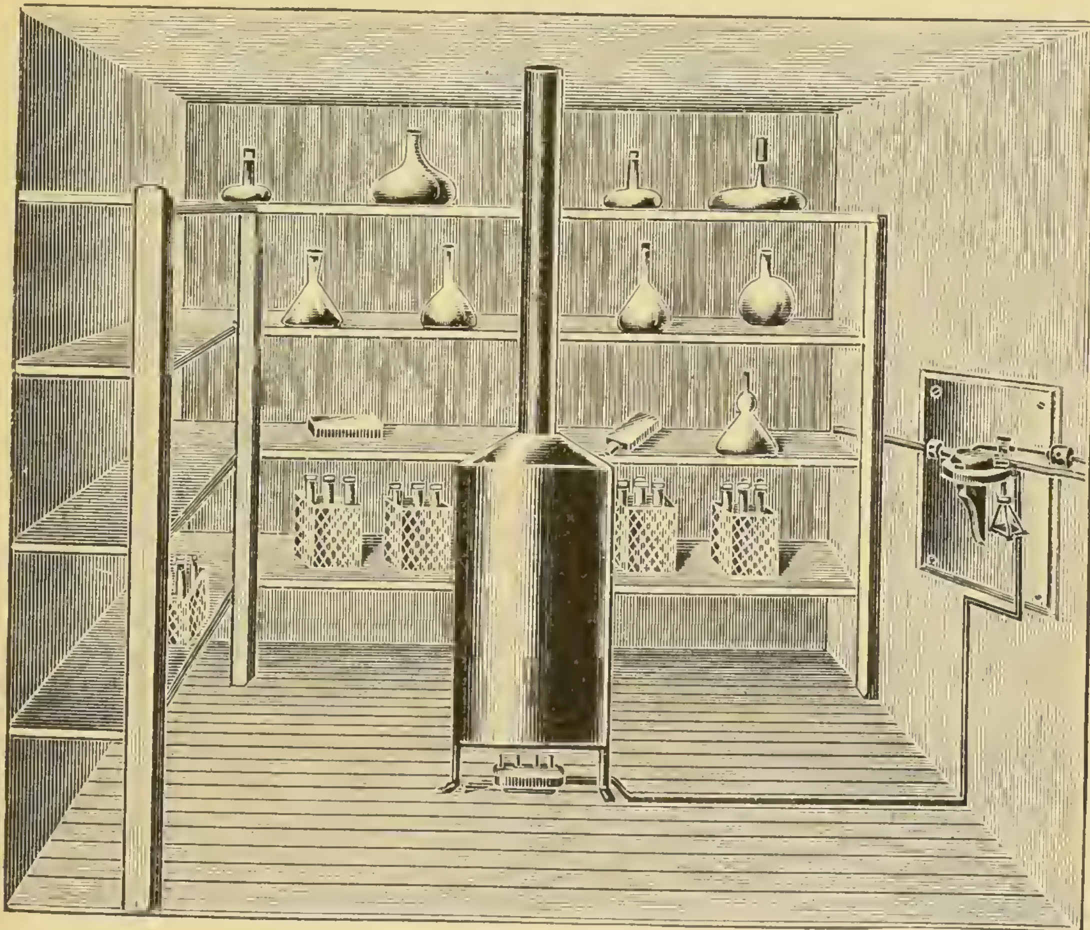


Fig. 67. — Bain-marie à chlorure de calcium de Pasteur.

Appareils à température constante.

Étuves a régulation directe. — De nombreuses espèces de Bactéries demandent, pour fournir une végé-


Fig. 68. — Installation d'une chambre-étuve chauffée à l'électricité (Hearson).

tation abondante, une température plus élevée que celle des chambres

ou des laboratoires, sujette à de trop grands écarts, du reste, dans ses variations diurnes et nocturnes. Quelques-unes, des pathogènes surtout, ne se développent qu'à une température assez haute, voisine de la normale du corps de l'hôte où elles vivent en parasites. Il est nécessaire, alors, de porter les cultures à un degré donné, degré qui doit être fixe, ou à peu près, et maintenu continuellement jour et nuit, si l'on ne veut pas avoir d'irrégularité dans le développement.

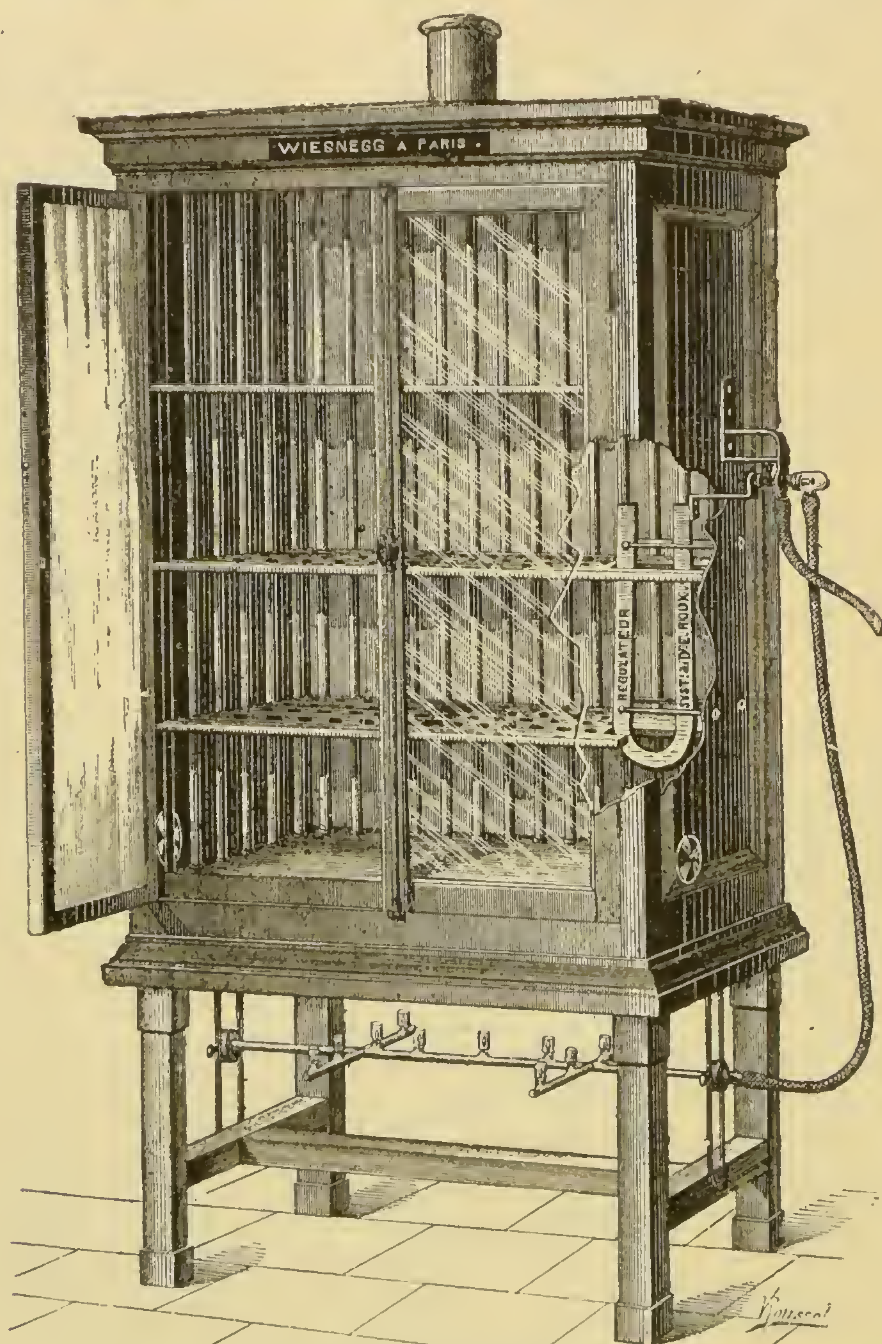


Fig. 69. — Étuve de Pasteur, modifiée par Roux (grand modèle).

La disposition la plus commode pour les laboratoires est l'installation d'une *chambre-étuve* de dimensions assez grandes pour qu'un homme puisse s'y mouvoir à l'aise dans l'espace laissé libre. Ce sont de véritables petites chambres, bien fermées, à doubles parois, chauffées par un appareil à thermosiphon muni d'un régulateur convenable, tel que le régulateur de Roux (Voy. p. 211), ou par l'électricité (fig. 68). Des rayons de bois, fixés au mur, permettent de disposer d'un grand espace pour les cultures ordinaires ou pour des dispositions exigeant une grande place. Le prix d'une telle installation est souvent un obstacle sérieux à son emploi.

On se sert d'habitude d'*étuves* se réglant automatiquement, une fois portées à la température voulue. Autour de la cavité centrale de ces appareils se trouve un intervalle de grandeur variable rempli d'air ou d'eau. Le fluide, en s'échauffant, sert de volant de chaleur, répartit uniformément la température et empêche un refroidissement trop rapide, soit par rayonnement, soit par déperdition directe, lorsqu'on ouvre l'étuve. De plus, c'est l'échauffement ou le refroidissement de la masse d'air ou d'eau qui agit directement sur les divers régulateurs adaptés à l'appareil.

Les grandes étuves construites sur le modèle de l'*étuve de Pasteur* répondent à tous les besoins d'un laboratoire. Ce sont de grandes armoires de bois (fig. 69 et 70), de $1^{m},15$ à $1^{m},30$ de haut sur $0^{m},70$ de large et $0^{m},40$ de profondeur, à double porte vitrée, pour éviter une trop grande déperdition de chaleur.

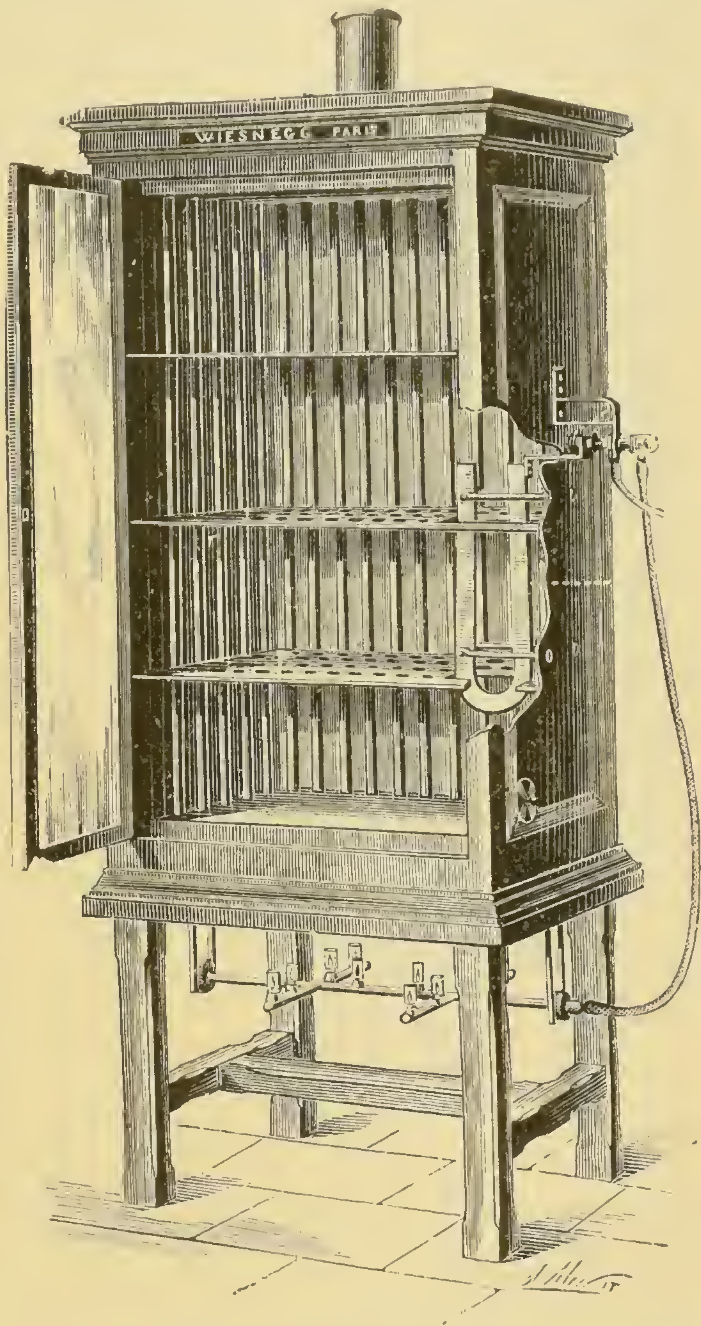


Fig. 70. — Étuve de Pasteur, modifiée par Roux (petit modèle).

L'armoire est divisée en un certain nombre de compartiments, qui sont inégalement chauffés, puisqu'ils sont à des distances différentes de la source de chaleur. La température, qui va en décroissant vers la partie supérieure, présente une différence de 2 degrés environ par étage. Cet avantage permet d'avoir des cultures à des températures différentes.

La paroi interne est formée d'une série de tubes de cuivre, disposés verticalement à une petite distance du bois et dans lesquels passent tous les produits de combustion dégagés par des brûleurs placés au-dessous de l'étuve. Une cheminée, disposée en haut, recueille ces gaz et les conduit au dehors.

Le régulateur, très spécial, imaginé par Roux (fig. 71 et 72), se compose de deux lames, l'une de zinc, l'autre d'acier, soudées ensemble et recourbées en forme d'**U**. La branche de gauche est fixe, l'autre se meut suivant les variations de la température. Au moyen d'une tige rigide, elle transmet ses mouvements à un piston d'admission du gaz placé extérieurement ; une vis V, rivée à l'extrémité de la tige de transmission,

permet de faire varier la longueur de celle-ci et, par suite, le réglage.

Lorsque la température s'élève dans l'étuve, la branche mobile de l'**U**, R, se rapproche de la branche fixe, emmenant avec elle la tige rigide qui s'éloigne du piston. Ce dernier, sollicité par un ressort à boudin placé dans son intérieur (fig. 71), réduit proportionnellement l'accès du gaz au brûleur. La température s'abaisse, le phénomène inverse se produit et, après quelques oscillations semblables, l'étuve est définitivement réglée.

Pour faire varier en plus ou en moins la température, il suffit d'augmenter ou de diminuer la longueur de la tige en tournant ou détournant

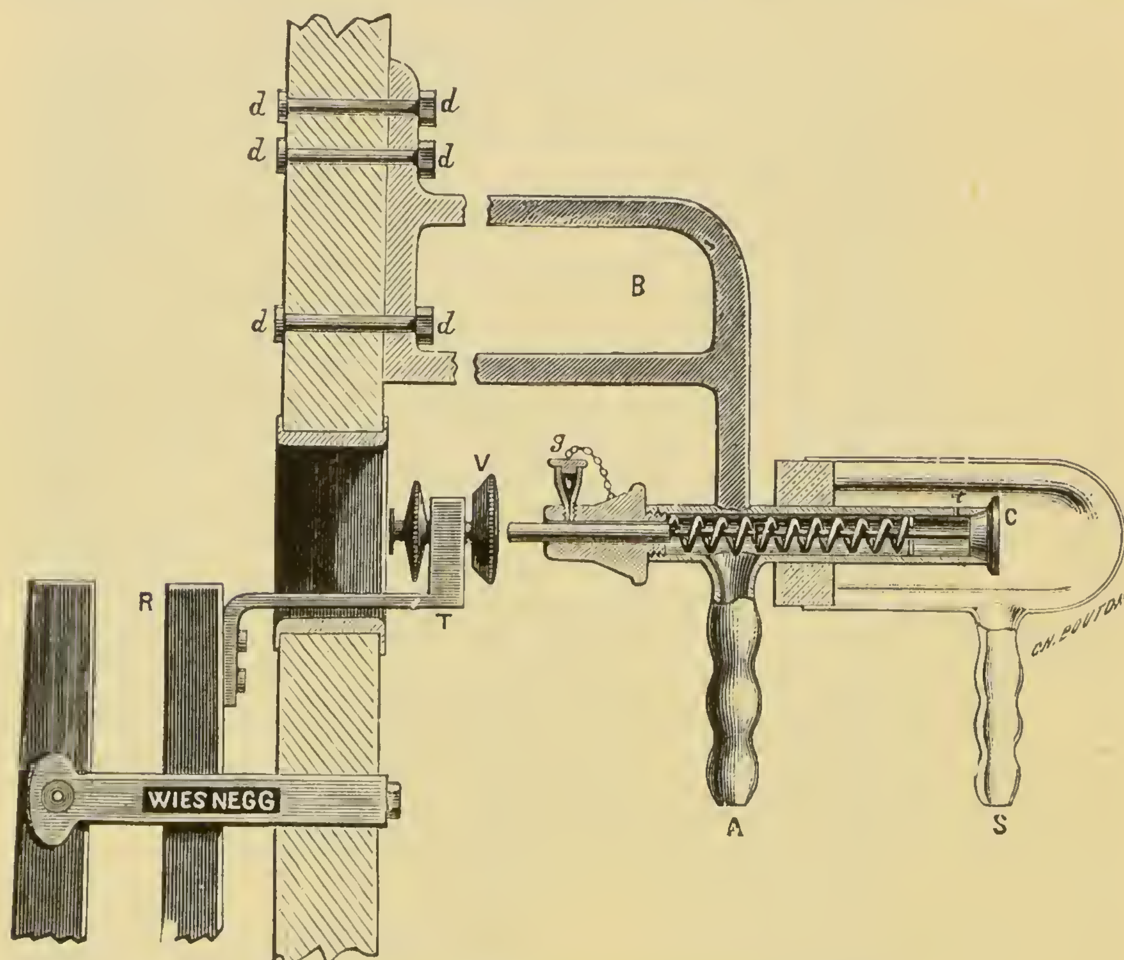


Fig. 71. — Régulateur métallique de Roux.

la vis V qui règle l'amenée du gaz en déterminant une plus ou moins grande obturation du tube d'amenée C (fig. 71). C'est sur cette même vis qu'agit le régulateur bimétallique par sa branche libre à laquelle elle est réunie.

Le prix assez élevé (500 francs et au-dessus) et les dimensions souvent trop grandes de ces appareils, leur font préférer des modèles plus petits, de prix notablement moindre.

Comme facilité de réglage et fixité de la température, l'étuve de d'Arsonval donne toute satisfaction. La cavité interne en est malheureusement trop étroite et la partie utilisable de cet espace est encore réduite par la forme en cylindre allongé et la disposition supérieure de l'ouverture. Pour se servir de toute cette cavité, on est forcé d'étager les cultures, ce qui occasionne souvent des accidents. Pour obvier à ces inconvénients, cette étuve a été modifiée de façon à s'ouvrir latéralement par une porte transparente à double verre, comme le repré-

sente la figure 73. Il est possible, avec ce modèle, de disposer d'une partie beaucoup plus grande de la cavité interne et de se rendre compte, de l'extérieur, de ce qui se passe au dedans. Comme l'indique la coupe représentée (fig. 74), le chauffage du matelas d'eau se fait par deux cheminées métalliques qui traversent le liquide dans toute sa hauteur, ce qui utilise presque toute la chaleur employée. Le maniement de l'étuve est le même que celui du modèle précédent. Comme cette étuve possède un régulateur entièrement métallique où la membrane de caoutchouc des appareils précédents est remplacée par une membrane métallique très souple, il est possible de la régler pour des températures bien supérieures à celle que l'on obtient avec les étuves précédentes à régulateur à membrane de caoutchouc; on peut arriver facilement à 100° et même au-dessus en se servant de liquide autre que l'eau comme matelas.

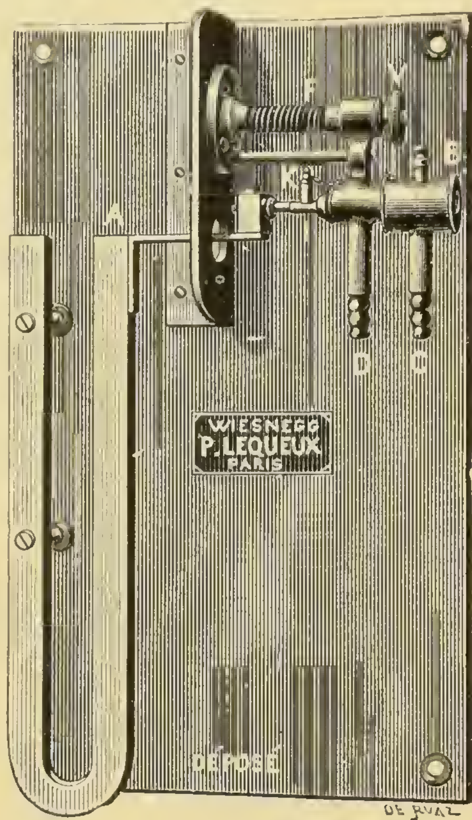


Fig. 72. — Régulateur Roux nouveau modèle monté sur panneau en fer pour chambre-étuve.

Lorsque ces étuves doivent fontionner longtemps, il est à recommander de verser dans le tube qui sert au réglage quelques gouttes d'huile pour empêcher l'évaporation d'une petite quantité d'eau pouvant modifier le réglage.

Les étuves carrées ou quadrangulaires, comme l'étuve Pasteur décrite plus haut, sont d'un maniement commode et pratique. La maison Lequeux en construit d'excellents modèles, établis d'après celui que Muenke (de Berlin) a fabriqué sur les données de Babès. La figure 75 représente une grande étuve de cette forme, à deux compartiments séparés par une cloison mobile. C'est, comme dans l'étuve de d'Arsonval, une épaisse couche d'eau qui entoure la cavité centrale de tous côtés, sauf de l'antérieur. La porte est formée de deux lames de verre entre lesquelles il existe une couche d'air de 2 millimètres d'épaisseur ; de ce côté, la déperdition de chaleur est insignifiante. Le corps de l'étuve est en fer-blanc ou, mieux, en cuivre, recouvert de feutre. On remplit d'eau la cavité périphérique par une des tubulures supérieures ; un tube à niveau indique la hauteur du liquide. C'est aussi cette masse d'eau qui sert à emmagasiner et à maintenir la chaleur, et à régler la chauffe en agissant sur le régulateur.

Le régulateur à membrane de caoutchouc de d'Arsonval s'applique difficilement aux étuves à parois planes, car, sous l'influence de l'élévation de la colonne d'eau dans le tube de verre, les parois se gonflent et enlèvent, par suite, toute précision à l'appareil. On peut cependant y arriver en enfermant la masse d'eau, qui constitue le corps dilatable agissant sur la membrane, dans un tube roulé en serpentin et plongé

lui-même dans l'eau formant la masse chauffante de l'étuve. Ce serpentin aboutit au régulateur ordinaire avec tube de verre semblable à celui de l'étuve cylindrique. Il est plus simple et tout aussi certain de se servir de régulateurs à mercure, ou du nouveau régulateur de d'Arsonval, représenté figure 78. La figure 76 représente le modèle de régulateur en verre que Lequeux joint à ses étuves de cette dernière forme. L'usage en est des plus simple. Il est fondé sur la dilatation du mercure par la chaleur. Le mercure, en se dilatant, monte dans le tube qui le contient et vient obturer plus ou moins com-

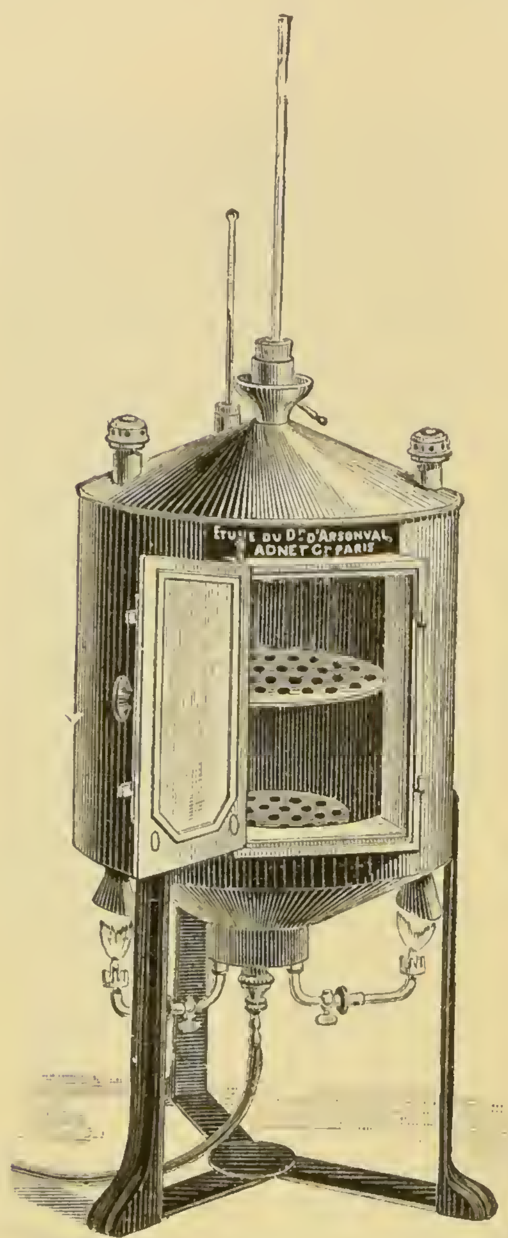


Fig. 73. — Nouvelle étuve auto-régulatrice de d'Arsonval.

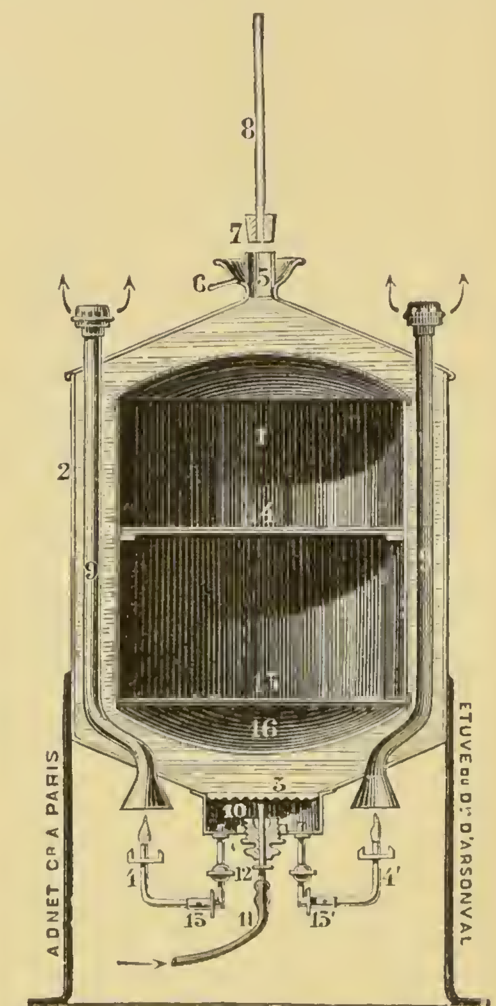


Fig. 74. — Coupe de la même étuve.

plètement l'orifice inférieur du tube A, par où arrive le gaz; la quantité de gaz qui passe par cet orifice est proportionnelle à sa grandeur. Le gaz sort par la tubulure B et va au brûleur. On commence par expulser tout l'air qui peut diviser la colonne de mercure en chauffant légèrement le réservoir à la flamme d'un bec de Bunsen, puis on plonge la partie inférieure du régulateur dans l'eau de l'étuve par une des tubulures supérieures où il est fixé par un bouchon qu'il traverse. A l'aide de la vis latérale V, qui commande un petit réservoir de mercure, on amène la surface de celui-ci à affleurer presque l'orifice inférieur du tube A. Il passe par cet orifice une certaine quantité de gaz qui sert à échauffer la masse d'eau par sa partie inférieure.

On débute en donnant une flamme assez grande pour que l'élévation

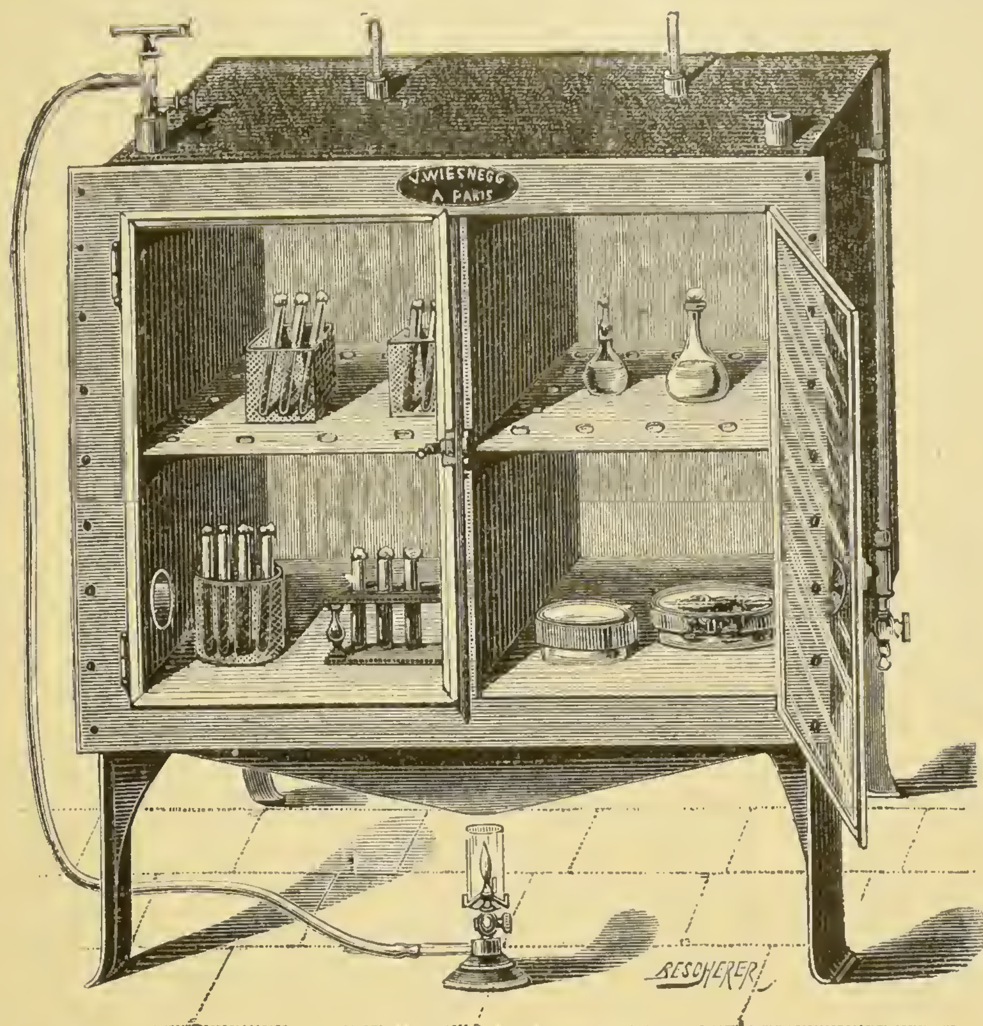


Fig. 75. — Grande étuve, modèle Babès, à deux compartiments.

de température soit plus rapide. Il est du reste facile de hâter l'échauffement en remplaçant une partie de l'eau froide par de la chaude en s'aidant de becs supplémentaires. Lorsqu'un thermomètre placé dans l'eau indique le degré voulu, on diminue l'arrivée du gaz en faisant refluer du mercure dans la cavité du régulateur à l'aide de la vis V. Au bout de quelque temps de tâtonnement, on arrive à obtenir la température fixe que l'on désirait. L'étuve est alors réglée pour cette température, à laquelle elle se remettra seule si l'on allume de nouveau après l'avoir laissé refroidir. Le réglage ne s'opère plus seul, mécaniquement, comme dans le régulateur à membrane de caoutchouc, l'observateur règle lui-même ; mais, comme pour l'autre, le réglage, une fois établi, se maintient seul. Pour éviter l'extinction fortuite du bec, les constructeurs ont muni la branche A d'arrivée du gaz d'un petit orifice supérieur qui se voit dans la figure immédiatement au-dessus de la branche B. Cet orifice est destiné à laisser passer un mince filet de gaz qui se rend directement au brûleur par la branche B et doit suffire seul à maintenir le bec allumé en veilleuse. Ce dernier résultat doit être obtenu avant le réglage

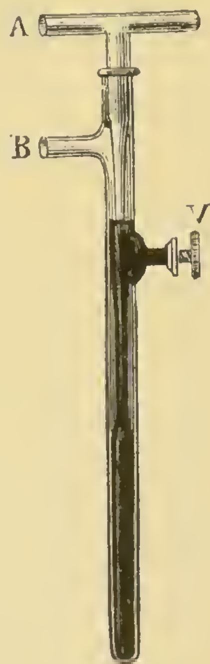


Fig. 76. — Régulateur à mercure.

définitif. Pour y arriver, on obture complètement l'orifice inférieur du tube A, en faisant monter du mercure à l'aide de la vis V, et l'on tourne le tube A jusqu'à ce que la flamme du bec soit réduite à l'état de flamme de veilleuse. On fixe la branche A dans cette position à l'aide d'une goutte de cire fondue. On laisse arriver le gaz en baissant le mercure et l'on procède au réglage comme il est dit plus haut. Il est entendu que la branche A est reliée au robinet d'arrivée du gaz et la branche B au brûleur. Un seul bec suffit pour maintenir l'étuve aux températures habituelles, 30°-37°. Il faut user de becs spéciaux à très faible débit, dont on protège la flamme contre les courants d'air par une petite cheminée de verre, de mica ou même de métal.

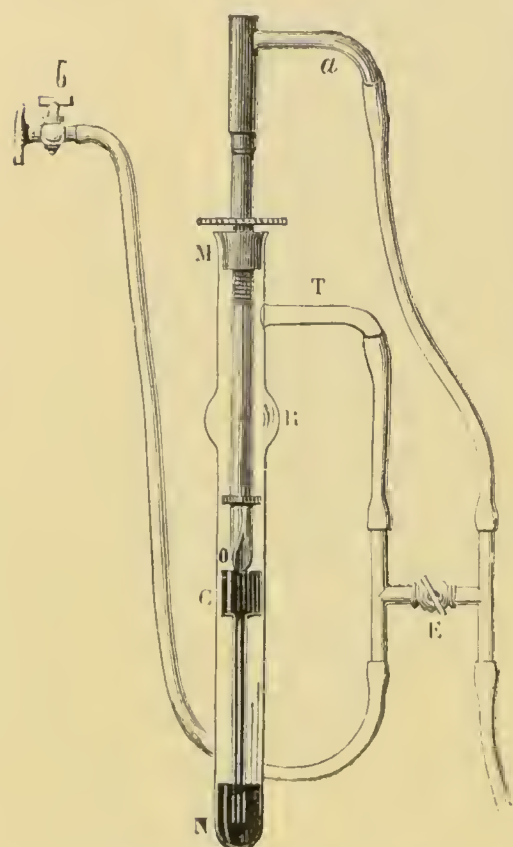


Fig. 77. — Régulateur de Schlœsing.

Le régulateur de Schlœsing (fig. 77), basé aussi sur la dilatation du mercure, est surtout applicable pour les hautes températures, pour les stérilisateurs à air chaud, par exemple. Le réglage se fait en enfonçant plus ou moins l'extrémité O du tube d'acier dans le mercure, ce qui se fait en vissant le haut. Le dispositif en H, qui se voit à côté, sert à laisser passer une très petite quantité de gaz pour éviter l'extinction lorsque la température s'élève vite.

D'Arsonval a imaginé un *régulateur métallique* bien supérieur à son régulateur à membrane de caoutchouc, qu'il remplace maintenant dans presque tous les cas. Une certaine quantité de liquide, en se dilatant ou se contractant suivant la température, agit sur une membrane métallique très souple, qui remplace la membrane de caoutchouc de l'ancien régulateur. Cette membrane obture plus ou moins l'orifice d'arrivée du gaz. L'appareil, le modèle mobile, est représenté figure 78. On remplit, par la petite cuvette 2, le tube 1 du liquide régulateur, pétrole ou huile d'olive. Ce liquide se dilate dès qu'on chauffe et vient se verser dans la cuvette 2. Lorsqu'on est arrivé à peu près à la température voulue, on ferme le réservoir au moyen du robinet à pointe 3. La quantité du liquide contenue dans le tube 1 subit une petite compression et exerce une action sur la membrane métallique située en 4. Au bout de quelque temps, si l'on remarque que la température est trop basse ou trop haute, on laisse sortir ou l'on fait rentrer une petite quantité de liquide. On obtient, après quelques tâtonnements, une température invariable.

Le régulateur à action directe de Lequeux (fig. 79) est entièrement métallique et basé, comme celui de Roux (p. 210), sur l'inégale dilatabilité de deux métaux. Il s'emploie, avec modification du tube métallique inférieur B, aussi bien aux températures comprises entre 30° et 100° qu'aux températures élevées comprises entre 100° et 600°.

Les variations de pression qui se produisent dans les conduites de

gaz peuvent avoir des résultats défavorables sur le fonctionnement des brûleurs. Aussi trouve-t-on avantage à interposer, entre le tube d'arrivée du gaz et l'appareil de réglage de l'étuve, un *régulateur de la pression.*

Le régulateur de pression Moitessier, construit par la maison Lequeux, remplit au mieux le but proposé (fig. 80). On le dispose comme sur la figure, en réunissant au robinet d'arrivée du gaz le tube dépourvu de robinet. On enlève le couvercle en dévissant la coupe et l'on remplit d'eau glycérinée le réservoir jusqu'à l'affleurement de la petite tubulure latérale qui se voit à gauche. Deux manomètres latéraux complètent l'instrument. L'un, antérieur, indique les oscillations de la pression dans les conduites ; l'autre permet de vérifier la pression du gaz à sa sortie et de constater l'action du régulateur. Quant au réglage de la pression, il faut s'assurer de la pression minimum des conduites de la ville et se tenir au moins quelques millimètres en dessous ; on règle cette pression au moyen du second manomètre, en tarant la coupe avec de la grenaille de plomb.

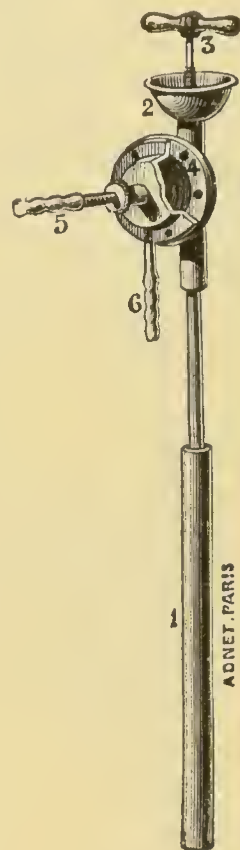


Fig. 78. — Nouveau régulateur de d'Arsonval, à membrane métallique.

Malgré toutes les précautions, l'extinction des brûleurs est à craindre. Il s'ensuit un dégagement de gaz, d'autant plus abondant que le régulateur en laisse, par refroidissement, passer une quantité relativement considérable. D'où possibilité d'explosion au contact d'une flamme.

Pour remédier à ce danger, Koch a fait construire des brûleurs spéciaux, se fermant automatiquement dès leur extinction. Deux lames métalliques, disposées en spirale, touchent la base de la flamme du bec. Lorsqu'on allume, ces spirales s'échauffent et subissent une torsion ; par refroidissement, elles se plient en sens inverse. C'est ce dernier mouvement qu'on utilise, en le faisant agir, au moyen d'un levier, sur un robinet dont est muni le brûleur, qui se ferme en interceptant le passage du gaz. Par malheur, à un usage tant soit peu prolongé, les ressorts se détrempent et arrivent à ne plus fonctionner à un moment donné, lors de l'extinction du bec.

Muenke, constructeur de Berlin, a imaginé un système de fermeture automatique basé sur les oscillations d'un petit volume de mercure, déterminées par la dilatation plus ou moins grande d'une masse d'air. L'appareil se compose essentiellement d'un tube thermométrique à grand réservoir, courbé en son milieu en forme de **V** très ouvert. Ce tube est fixé par son coude sur un support, de manière à pouvoir facilement osciller à droite et à gauche, dans un parcours réduit, à l'aide de buttoirs. On introduit du mercure dans l'appareil, de la façon habituelle, en ayant soin de laisser une assez grande quantité d'air dans le réservoir. On s'arrange pour qu'à la température ordinaire le mercure introduit fasse contrepoids du côté du réservoir et basculer le tube coudé en ce sens. En chauffant alors ce réservoir, l'air se dilate et chasse

une partie du mercure dans la branche opposée ; l'équilibre se détruit, le **V** bascule dans une position inverse où il se maintient tant que, la température baissant, le mercure passe en quantité suffisante dans la branche du réservoir, par suite de la contraction de l'air que celui-ci renferme. Lorsque l'appareil marche, le réservoir est chauffé par un petit bec en veilleuse branché sur le tube qui conduit le gaz au brûleur ; le tube en **V** penche du côté opposé du réservoir, où le mercure est chassé par la dilatation de l'air de ce dernier. Si le brûleur vient à s'éteindre, il en est de même du petit bec placé sous le réservoir ; le mercure remonte dans ce dernier et fait basculer de son côté. Au moyen d'un système de leviers, ce mou-

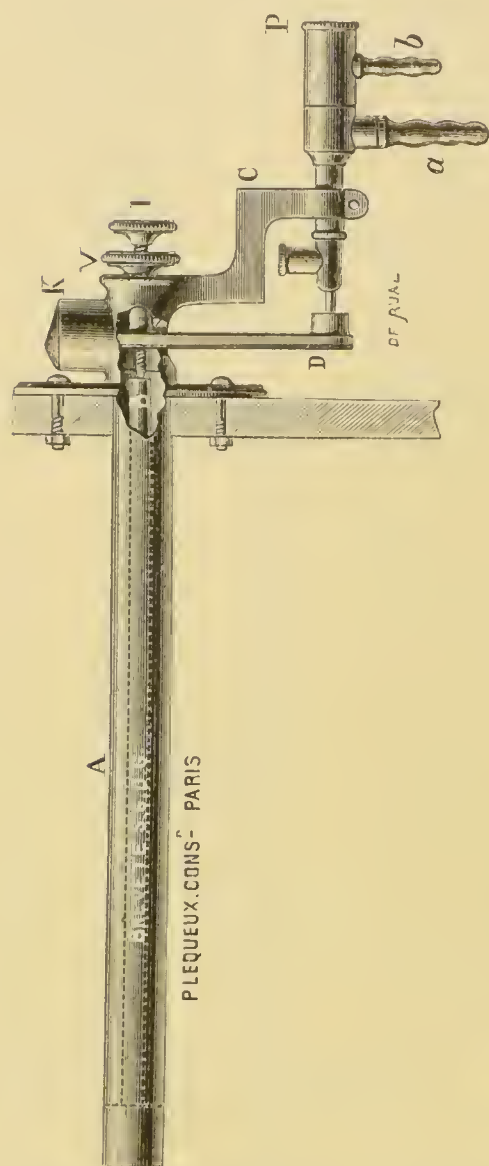


Fig. 79. — Régulateur à action directe, nouveau modèle.

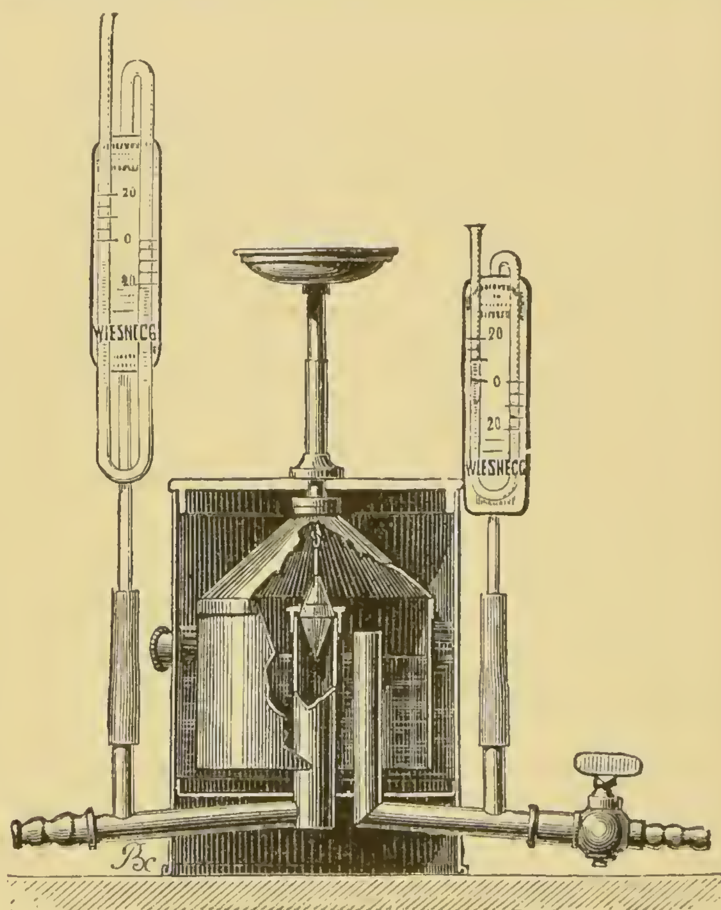


Fig. 80. — Régulateur de pression de Moitessier.

vement ferme un robinet qui se trouve sur la conduite d'amenée du gaz.

Les accidents proviennent presque toujours de la rupture des tubes de caoutchouc destinés à relier le régulateur au robinet d'arrivée du gaz et au brûleur. Aussi est-il à recommander de les remplacer le plus qu'on peut par des conduites de métal, en n'usant de caoutchouc que pour les raccords indispensables, qui doivent être faits les plus courts possible et droits, de façon à éviter toute traction aux points d'union consolidés toujours à l'aide de liens en fil de cuivre.

Il est tout à fait à recommander, quand c'est possible, de disposer les étuves dans des cages communiquant avec l'extérieur par une cheminée. Lorsqu'on fait fonctionner en même temps plusieurs étuves, il faut les isoler avec soin dans des cages spéciales ou dans des pièces différentes et n'en approcher de lumière que lorsqu'on s'est assuré que les becs

brûlent. C'est le moyen le plus pratique de se mettre sûrement à l'abri des accidents. Les cages peuvent être construites en carrelages de porcelaine unis avec du ciment et fermés par une porte vitrée, ou, plus simplement, en tôle. Si le gaz vient à s'éteindre, il ne pénètre pas dans la pièce, mais est entraîné au dehors par la cheminée ; aucun accident n'est à craindre.

Lorsqu'on n'a pas le gaz à sa disposition, il peut être nécessaire d'user d'autres modes de chauffage. Le chauffage des étuves à l'électricité supprimerait ces grands inconvénients du gaz. Des *étuves électriques* ont déjà été imaginées (1) et pourraient servir avec avantage. La figure 82 représente l'application du chauffage par l'électricité à une grande étuve Pasteur. Il existe différents modèles d'étuves chauffées au pétrole, donnant d'excellents résultats. La figure 81 représente un de ces modèles construit par Adnet. Le principe du réglage est le même que celui de l'étuve de d'Arsonval décrite précédemment (fig. 74). Le réglage s'obtient en laissant pénétrer plus ou moins le calorique produit par la lampe. La membrane régulatrice est influencée par l'eau, comme dans l'étuve à gaz, et agit sur le levier que l'on voit à gauche de la figure : ce levier fait lever ou baisser un disque qui permet, suivant sa situation, un passage rapide ou lent de gaz chauds et, par conséquent, une chauffe plus ou moins grande.

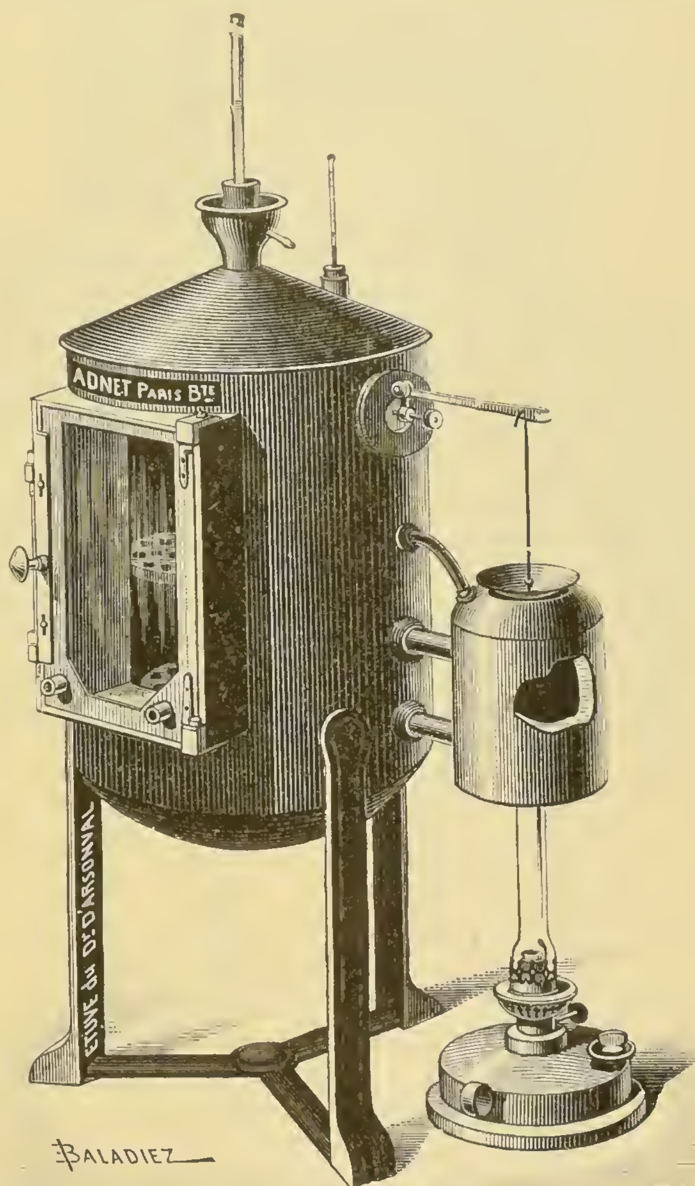


Fig. 81. — Étuve chauffée au pétrole.

On peut aussi, comme l'indique Salomonsen (2), se servir, pour chauffer une étuve ordinaire, de plusieurs veilleuses flottant sur un large vase rempli d'eau aux deux tiers, puis d'une couche d'huile à brûler de 2 à 3 centimètres de hauteur ; on cherche alors, par tâtonnements,

(1) Rihaud et Fouilland, Étuves électriques (*Soc. de Biol.*, 8 novembre 1902). — Marmier, Sur le chauffage électrique des étuves à température constante (*Ann. de l'Inst. Pasteur*, XVI, 1902, p. 779).

(2) Salomonsen, Technique bactériologique, trad. française, p. 72.

à quelle distance du fond de l'étuve il faut placer les flammes pour obtenir la température cherchée. La température obtenue n'est, il est vrai, jamais bien fixe, puisqu'il n'y a pas de compensations aux refroidissements du milieu ambiant, mais les écarts peuvent n'être que peu considérables et ne sont à prendre en sérieuse considération que lorsqu'il s'agit d'espèces ayant des besoins spéciaux sous ce rapport. On peut du reste y remédier en ajoutant une ou plusieurs veilleuses et surtout en plaçant l'appareil dans un endroit où les variations de température sont peu considérables, un sous-sol par exemple. Avec un peu de pratique, une telle disposition, peu coûteuse, peut rendre d'excellents services.

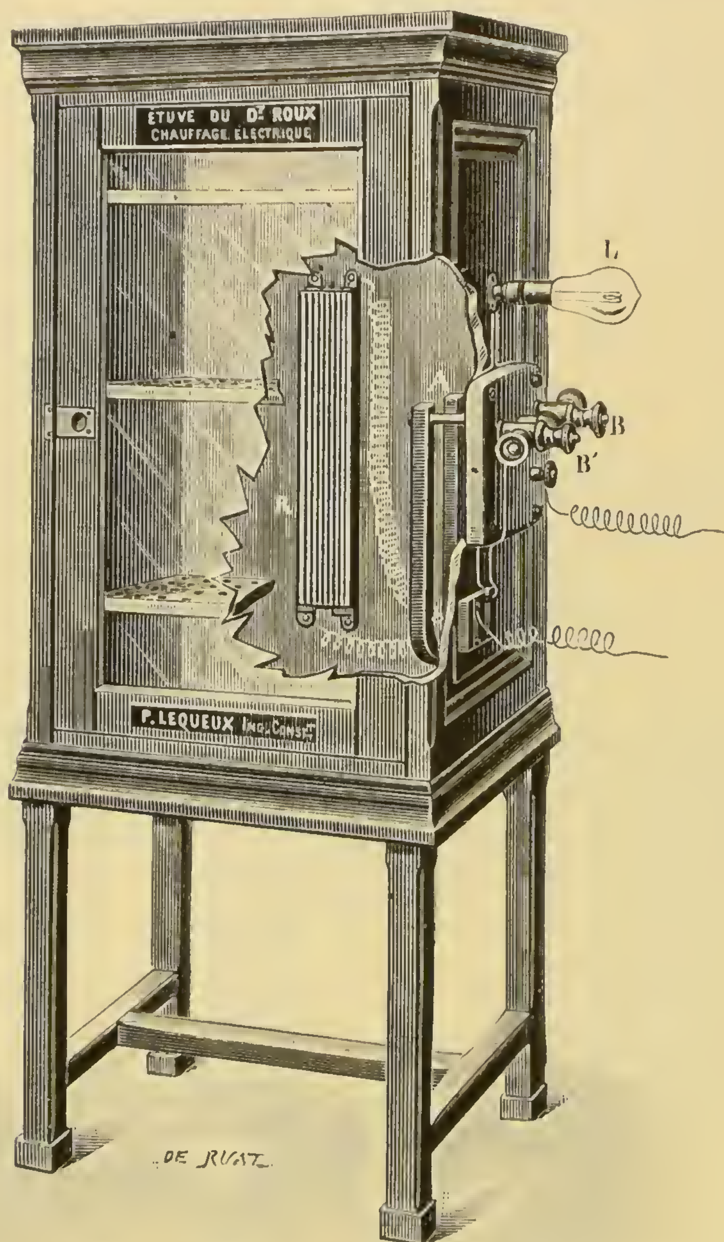


Fig. 82. — Étuve Pasteur avec chauffage à l'électricité.

Il peut être nécessaire d'user de températures plus basses que la température ambiante, en été par exemple, lorsqu'on veut maintenir des cultures à une température de 15° à 20° et que la température des locaux atteint souvent 30°. On y arrive à l'aide des armoires-glacières ordinaires, très usitées aujourd'hui dans les ménages, en réglant le refroidissement par un faible apport de glace. On peut aussi faire passer dans la double paroi de l'étuve un courant d'eau dont la température ne dépasse pas 20°; il est très facile d'adapter aux différents systèmes d'étuves un dispositif très simple qui conduise au but cherché.

Pour obtenir des températures basses, cultiver des microbes au-dessous de 10°, il faut employer la glace; les armoires-glacières se maintiennent facilement à ces températures.

Lorsqu'on a besoin de températures plus basses encore, zéro degré par exemple, on peut se servir très avantageusement de l'étuve-glacière imaginée par Miquel pour conserver à zéro degré les eaux destinées à l'analyse

bactériologique. Cette étuve (fig. 83) est composée de deux boîtes concentriques, dont l'intérieure E reçoit, par une porte latérale, les objets à conserver; l'extérieure E, plus grande, est revêtue d'un feutre isolant. La cavité comprise entre les deux est destinée à recevoir la glace; l'eau de fusion s'écoule par la partie inférieure à l'aide du tuyau T. Cette étuve peut également servir pour les températures entre 0° et 25°, en y faisant couler de l'eau de la canalisation. Cette eau, tombant par la pomme d'arrosoir S sur la boîte antérieure, y abaisse notablement la température.

Lorsqu'on veut observer, sous le microscope, des Bactéries à des températures constantes et assez élevées, on doit s'adresser à des appareils spéciaux, permettant de maintenir la préparation au degré voulu, tout en la laissant observer. La platine chauffante de Ranvier est d'un bon usage, quand on peut la réunir à une étuve de l'un des modèles précédents dont on fait la source de chaleur. La *chambre chaude* de Vignal (fig. 84) est bien préférable (1). C'est une petite étuve de d'Arsonval, à manchon d'eau et à régulateur à membrane de caoutchouc, modifiée dans sa forme, afin de pouvoir être adaptée aux études microscopiques. Le réglage se fait comme celui de l'étuve ci-dessus décrite. Il est possible de se servir, avec cet appareil, de l'éclairage Abbé, grand avantage que n'a pas le modèle Ranvier. La préparation est introduite dans la cavité de l'étuve par la porte B que l'on soulève et qui est aussitôt remise en place. L'appareil peut rester à demeure sur le microscope, ou être placé sur un support de même hauteur, pendant le temps que doit durer l'observation. La température initiale se maintient sans varier pendant un temps très long. Kraus (2) décrit un semblable appareil chauffé par l'électricité, qui, d'après lui, se réglerait avec une grande précision et se maintiendrait facilement à la température obtenue ; l'appareil est construit par la maison Reichert (de Vienne).

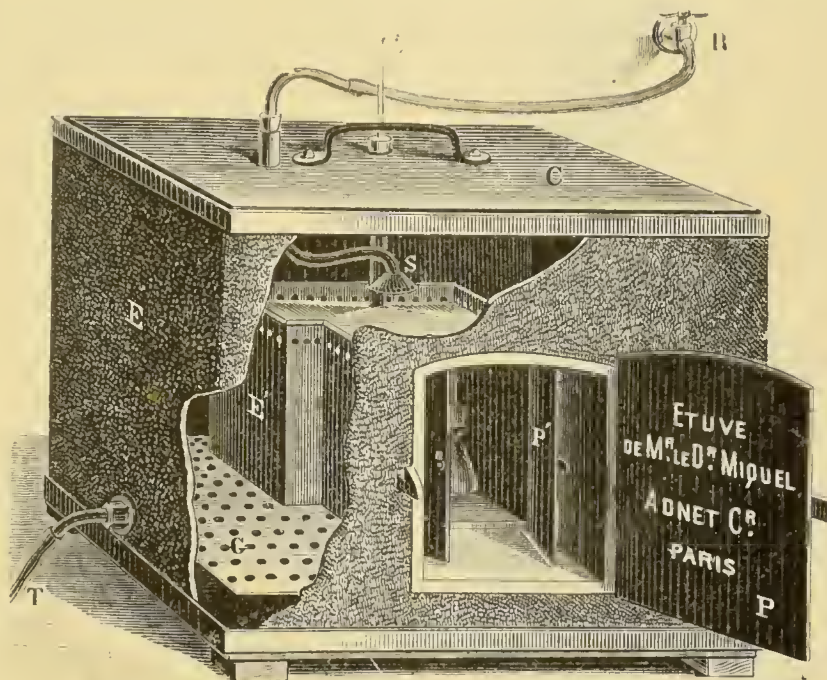


Fig. 83. — Étuve de Miquel.

Pour de telles observations, Nuttall (3) a imaginé de placer le micro-

(1) Vignal, Chambre chaude à régulateur direct pour le microscope (*Arch. de physiol.*, 1885, n° 5).

(2) Kraus, Ueber einen elektrisch geheizten und regulierbaren Objeckstisch (*Centralbl. für Bakt.*, XXIII, 1898, p. 16).

(3) Nuttall, *Zeitschr. für Hygiene*, IV, 1888, p. 373.

scope entier dans une petite étuve spéciale qui ne laisse libres à la partie supérieure que le tube dans une partie de sa longueur et la vis micrométrique. Les différents éclairages s'obtiennent au moyen d'ouvertures fermées par une glace. Deux côtés et le dessus de l'étuve sont mobiles au moyen de charnières et permettent de disposer l'appareil d'une façon convenable à l'observation. Le chauffage et le réglage s'obtiennent comme dans les étuves ordinaires. Son appareil n'est du reste qu'une modification perfectionnée d'une petite étuve construite par Zeiss sur les indications de Pfeiffer (fig. 85). Le modèle (fig. 86) imaginé par Plehn est d'une commodité plus grande.

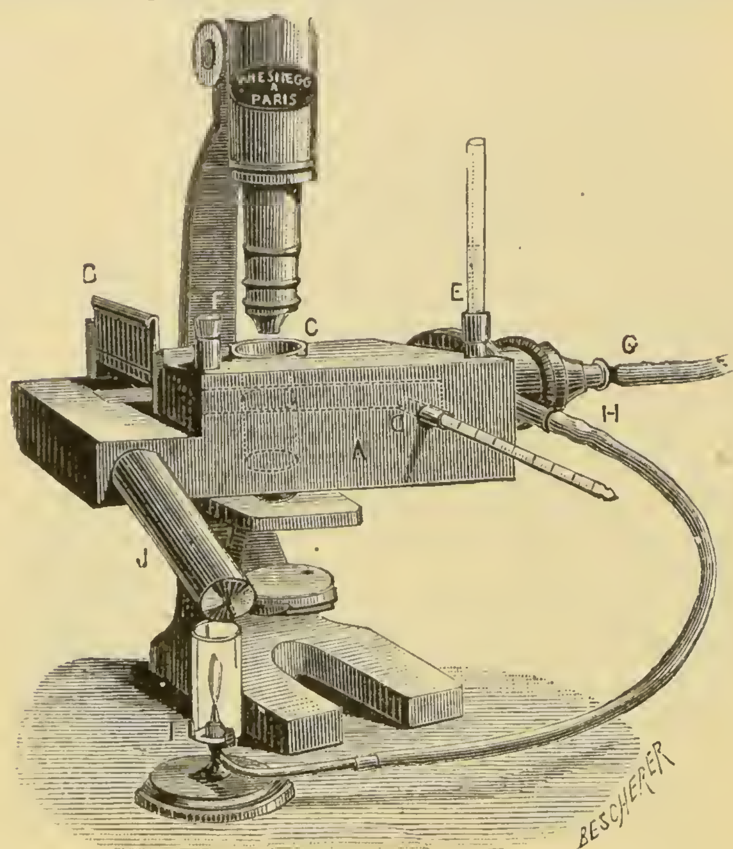


Fig. 84. — Chambre chaude de Vignal.

Les appareils qui viennent d'être décrits rendent d'excellents services dans les recherches de bactériologie et facilitent considérablement l'étude de cette science. Il ne faudrait cependant pas croire que des instruments aussi coûteux et aussi variés soient d'une nécessité absolue pour aborder ce genre de travaux. Loin de là ; l'installation peut se faire sans trop de frais et cependant dans des conditions qui permettent d'en profiter avec fruit. Il est facile de modifier à volonté les moyens employés, pourvu que l'on soit bien certain d'arriver sûrement au résultat désiré.

Le microscope constitue la plus forte dépense. En le comprenant dans la liste d'instruments que tout médecin qui travaille devrait posséder, on réduit à peu de chose le prix à consacrer à une installation. L'étuve à air et le bain-marie sont les deux objets qui rendront le plus de services. Le coût du modèle très simple de la première est peu élevé ; tout ouvrier pourra en fabriquer une à bas prix, en tôle de fer ou de cuivre rivé. Il est facile aussi de se faire construire à bas prix un appareil du genre du stérilisateur à vapeur de Koch. Une marmite de taille convenable fait on ne peut mieux office de bain-marie. Ajoutons à cela plusieurs douzaines de tubes à essai, quelques verres de montre, entonnoirs, ballons, cristallisoirs, capsules de porcelaine, et nous pourrons aborder, avec ce petit bagage, des recherches bactériologiques sérieuses, à la condition d'apporter avec lui gros de minutie, de patience et de scrupuleuse attention.

II. — CULTURES.

1° Généralités sur les milieux de cultures.

S'il fallait s'en rapporter au hasard des circonstances, il serait bien rare et bien difficile de pouvoir se faire une idée un peu complète des conditions biologiques et des propriétés physiologiques des espèces. L'observateur qui veut étudier une espèce a grand avantage à l'isoler, à la faire vivre à part, à l'abri des influences défavorables à sa vie, en lui fournissant un aliment qui lui convient. Il lui est alors facile d'obtenir des notions exactes sur les phénomènes produits, sur l'action des différents agents qu'il peut employer, assuré dès lors que les résultats ne sont pas troublés par des inconnues de milieu ou par des interventions étrangères. On a donc cherché à faire vivre les Bactéries, à les *cultiver*, dans des milieux artificiels où l'on en apportait la semence : c'est le procédé des *cultures*. C'est Pasteur qui a posé les bases de cette méthode féconde de recherches, dans ses belles études sur la fermentation lactique et sur les organismes en suspension dans l'atmosphère (1).

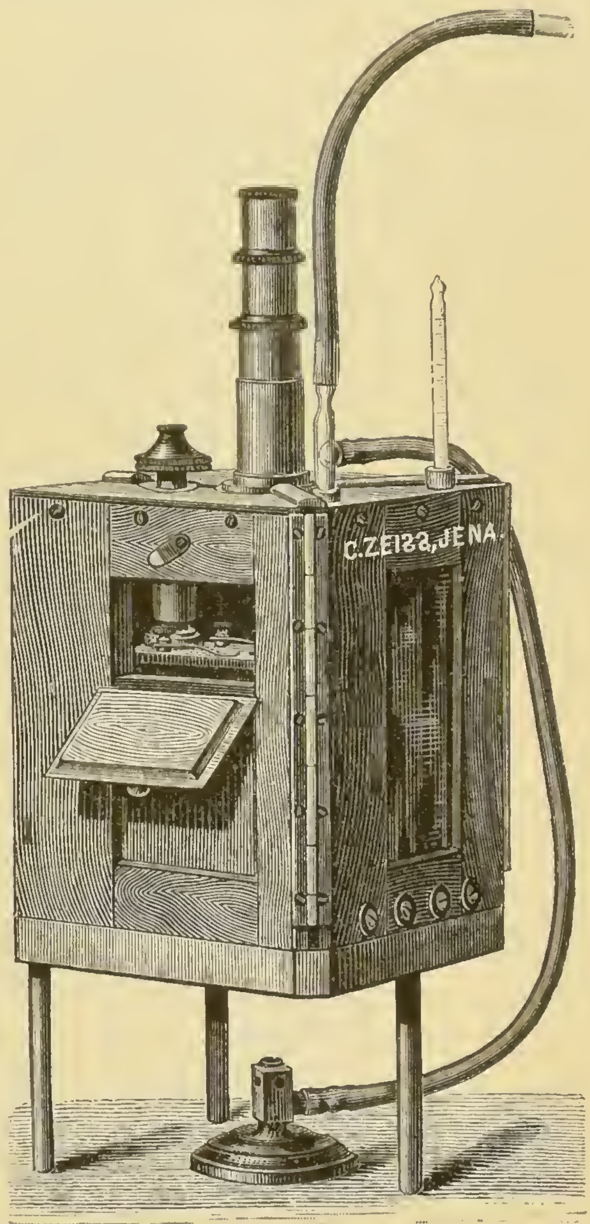


Fig. 85. — Étuves pour observations au microscope.

Le principe qui domine tout dans cette étude est l'obtention de *cultures pures*; on y parvient à l'aide de procédés qui vont être décrits et qui ont tous pour objet l'usage de milieux purs de tous germes, *stériles* ou *stérilisés*, et de matière d'ensemencement, ne contenant que la seule espèce à étudier. C'est là, on peut le dire, la base et la clef des études bactériologiques.

On avait découvert les Bactéries dans les liquides ; on savait par expérience qu'elles pullulaient rapidement dans les infusions organiques ; l'emploi de ces liquides était tout naturellement indiqué. L'usage en a longtemps prévalu ; certains d'entre eux forment, du reste, encore maintenant, le terrain que préfèrent bien des espèces. Elles s'y développent très vite, les envahissent en tous sens ; mais souvent le dévelop-

(1) Pasteur, Mém. sur la fermentation appelée lactique (*C. R. de l'Acad. des sc.*, XLV, 1857, p. 913), et Mém. sur les corpuscules organisés qui existent dans l'atmosphère (*Ann. des sc. nat., Zool.*, 4e sér., t. XVI, 1861).

pement s'arrête bientôt, par épuisement du milieu ou diffusion dans sa masse de produits d'excrétion nuisibles ; ou, s'il continue, c'est avec lenteur, en donnant naissance à des formes de dégénérescence, les formes d'involution, qui prouvent que l'espèce vit mal. Il ne se forme que rarement des Zooglées d'aspect quelque peu caractéristique ; la gelée, produite par la couche périphérique de la membrane, difflue et ne peut plus retenir les éléments accolés, ils se répandent dans tout le liquide. Enfin, s'il existe des germes différents, il peut être difficile de s'en apercevoir et de les séparer : ils se mêlent en effet trop intimement les uns aux autres.

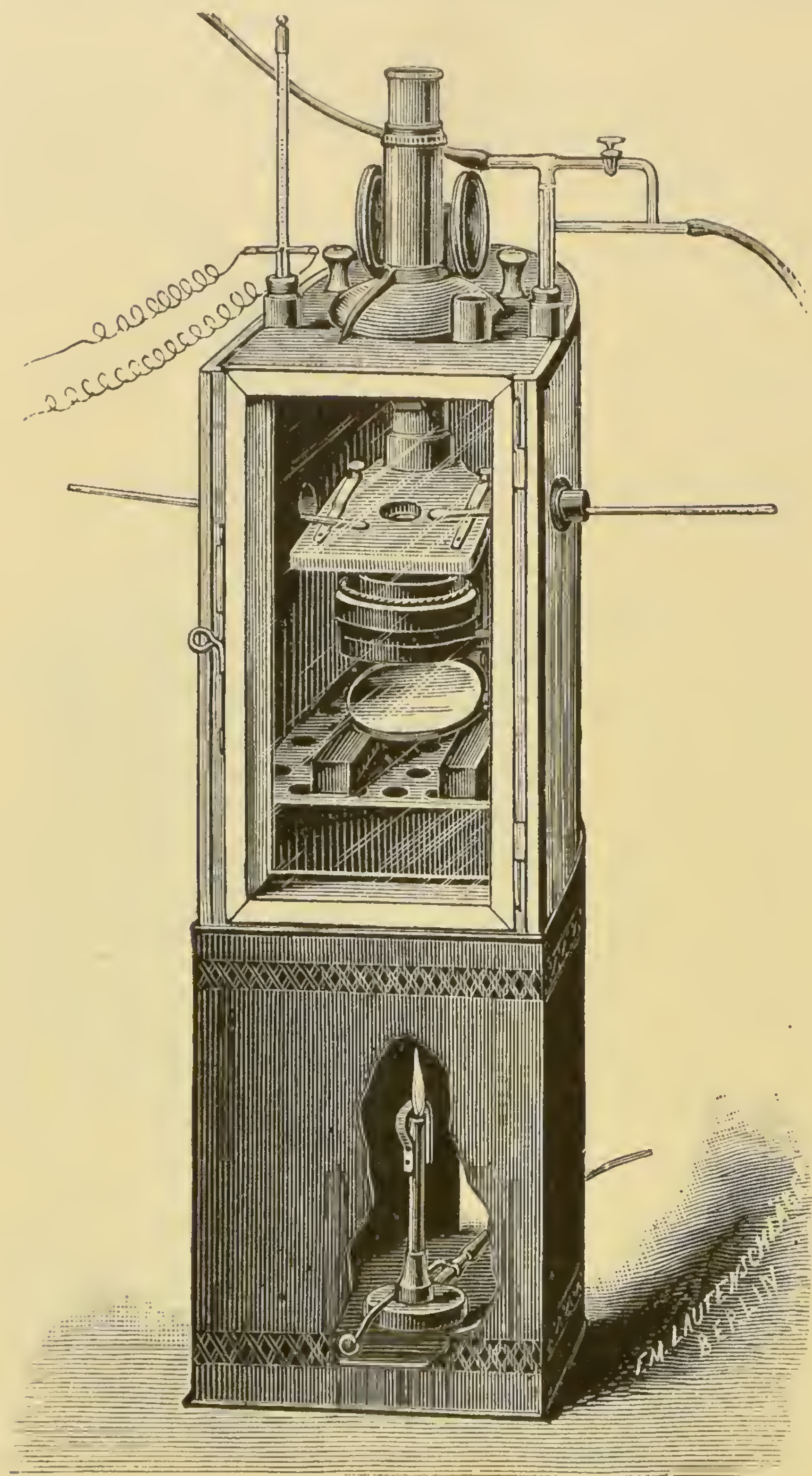


Fig. 86. — Étuve pour microscope, modèle Plehn (Lautenschläger).

Les milieux solides, au contraire, tout en fournissant un sol nutritif excellent aux Bactéries, permettent aux amas, *colonies* ou *Zooglées*, provenant de leur développement de mieux se délimiter, en s'opposant à leur éparpillement dans la masse; elles y prennent un aspect très constant et souvent caractéristique ; s'il existe des germes différents, ils peuvent évoluer séparément, et former des Zooglées séparées, de sorte qu'il devient plus facile de les isoler.

La forme de la culture et la facilité d'isolement des espèces sont les deux grands avantages des milieux solides, qui présentent plus rarement les luxurieuses végétations si fréquentes dans les bouillons nutritifs ; les milieux liquides doivent être conservés surtout comme moyens de se procurer d'abondants matériaux. Si l'on joint à ce dernier caractère la facilité plus grande de préparation et de stérilisation, on comprendra

que les bouillons doivent occuper une place de première importance dans les méthodes de cultures.

La plupart des milieux employés sont loin d'avoir une composition rigoureusement établie et surtout constante. La raison en est dans l'emploi, pour leur préparation, de produits animaux ou végétaux variant toujours plus ou moins dans leur constitution. Ces particularités ont souvent une influence sur le développement des microbes à leurs dépens.

Quand il s'agit non plus de l'étude générale, mais de l'identification d'une espèce, pour rapporter les caractères observés aux descriptions déjà données, il devient nécessaire, si l'on veut pouvoir établir des comparaisons exactes, de se placer d'une façon rigoureuse dans les conditions du premier expérimentateur. Or, la chose devient souvent difficile précisément à cause de ces variations de milieux tenant à la différence des procédés employés pour leur préparation ou aux différences parfois notables existant dans les produits mis en œuvre.

Il serait certainement des plus profitable d'admettre, comme le propose Grimbert (1), l'adoption d'une série de milieux, que l'on pourrait appeler *milieux normaux*, dont la constitution, la préparation seraient, autant que possible, arrêtées, après entente, d'une façon définitive, et auxquels on pourrait alors se reporter pour la comparaison et la détermination avec beaucoup plus de chance de réussite. Malheureusement, il n'est pas possible de songer à une identité absolue pour beaucoup de ces milieux, parce qu'on ne peut guère se procurer certains de leurs constituants d'une composition absolument constante ; il en est surtout ainsi, par exemple, pour la viande dont la composition est variable, dans une même espèce, suivant l'état de l'individu, suivant la manière de la mise à mort, le temps écoulé depuis la mort, etc. ; pour la gélatine, pour les peptones si variables sous la même marque, pour bien d'autres choses encore. De plus, dans la préparation même, il est des conditions qu'il est difficile de réaliser chaque fois d'une manière rigoureusement identique, la neutralisation par exemple. De telle sorte que l'on doit reconnaître qu'il devient très difficile ou même impossible d'arriver à opérer dans des conditions tout à fait identiques. Cependant, en arrêtant d'une façon très précise la manière de faire, on pourrait éliminer un assez grand nombre de conditions qui peuvent établir des différences notables.

A côté de ces milieux normaux, on sera libre d'en employer d'autres; on pourra même en tirer de sérieux avantages, mais les caractères obtenus à l'aide des premiers donneraient toujours des points de comparaison de grande valeur.

Quant à vouloir supprimer complètement les milieux de composition complexe, peu déterminée ou variable, c'est aller un peu trop loin, aujourd'hui du moins.

Ainsi, on ne peut pas encore se passer des bouillons ordinaires ; qu'on les prépare par les anciens procédés, qui sont, il faut le reconnaître, un peu trop pot-au-feu, ou par des procédés plus rapides, on n'en aura pas moins des liquides ne pouvant pas être rigoureusement identiques à cause des grandes différences que peut présenter la viande, comme il a été dit plus haut.

Sans doute, ici, l'idéal serait d'employer des milieux de composition

(1) Grimbert, De l'unification des méthodes de culture en bactériologie (*Arch. de parasitologie*, I, 1898, p. 191).

aussi rigoureusement établie que celle des liqueurs titrées des chimistes Mais on en est encore bien loin, parce que la pratique force vite à reconnaître qu'aucun des nombreux milieux essayés et proposés à ce point de vue ne possède la valeur générale des anciens. Ils réussissent fort bien dans des cas particuliers, pour une ou quelques espèces, mais ne peuvent s'appliquer à la grande généralité comme les autres. De sorte qu'il faudrait une variété considérable de ces milieux dont la composition devrait, pour ainsi dire, varier pour chaque espèce, et cette composition exigerait, pour être déterminée dans chacun des cas, de nombreux essais, ce qui ne serait pas une petite besogne.

D'ailleurs, il est bien difficile de penser qu'on puisse jamais assimiler les développements dans les milieux à de véritables réactions chimiques. Si, en effet, un des facteurs de la réaction, le milieu, pouvait arriver à avoir une constance absolue, l'autre facteur, le microbe, apparaît comme de plus variable dans ses propriétés, surtout dans celles qui doivent entrer en jeu ici, les propriétés biologiques. L'influence de la semence employée se fera toujours sentir, quoi qu'on fasse, du côté du milieu. Pour des raisons que nous n'entrevoyons encore pas, la plupart du temps, le microbe se met à ne plus manifester certaines de ses propriétés biologiques importantes, ne sécrète plus certaines diastases, ne transforme plus les aliments dans le même sens, ne produit plus de pigment, plus de lumière, etc. Le milieu a beau être normal, la réaction cherchée ne se produit plus et ne peut conséquemment servir à l'identification. On ne peut donc jamais avoir en lui la confiance que le chimiste a dans le nitrate d'argent pour la recherche des chlorures, parce que les phénomènes vitaux qui entrent ici en jeu ne peuvent être maniés et dirigés par l'expérimentateur à sa volonté et avec toute certitude.

Ces réserves faites, il faut reconnaître qu'il devient indispensable de préciser et de fixer les conditions dans lesquelles les milieux de cultures doivent être préparés. Et, ici, une entente générale serait bien nécessaire.

2° Préparation des milieux de cultures.

1° *Milieux liquides.*

Les liquides qui ont été employés pour la culture des Bactéries sont très nombreux ; nous nous bornerons à en citer quelques-uns. Les mélanges, aussi nombreux que variés, dont se sont servis différents observateurs, ne possédant aucun autre avantage que de compliquer singulièrement la technique, il est à conseiller de se restreindre à l'usage de quelques milieux, des meilleurs, que l'expérience, du reste, apprend vite à préférer, et à conserver les autres pour l'étude de cas particuliers où ils peuvent rendre, du reste, d'excellents services.

MILIEUX LIQUIDES CHIMIQUEMENT DÉFINIS

Pasteur (1), le premier, a imaginé de faire développer les Bactéries dans des solutions salines de composition chimique connue. La formule

(1) Pasteur, Mémoire sur la fermentation appelée lactique (*Ann. de phys. et chim.*, 1859).

du liquide qu'il employait, connu de tous sous le nom de *solution de Pasteur*, était la suivante :

Liquide de Pasteur.

Eau distillée	100 grammes.
Sucre candi	10 —
Cendres de Levure de bière	0gr,075

Pour cultiver la Levure de bière, Pasteur y ajouta 0gr,1 de tartrate d'ammoniaque.

Cette solution fut modifiée plus tard par Cohn (1) et Mayer (2); le sucre candi, trop favorable au développement des Moisissures, fut supprimé, et les cendres de Levure de bière remplacées par des sels pouvant entrer dans l'alimentation des êtres inférieurs. La *liqueur de Cohn*, encore en faveur dans certains laboratoires d'Allemagne, est ainsi composée :

Liquide de Cohn.

Eau distillée	200 grammes.
Tartrate d'ammoniaque	2 —
Phosphate de potasse	1 gramme.
Sulfate de magnésie	1 —
Phosphate tribasique de chaux	0gr,1

Naegeli (3) recommande les formules suivantes, à employer suivant les cas :

Liquide de Naegeli n° 1.

Eau	100 grammes.
Tartrate d'ammoniaque	1 gramme.
Phosphate bipotassique	0gr,1
Sulfate de magnésie	0gr,02
Chlorure de calcium	0gr,01

Le tartrate d'ammoniaque peut être remplacé par du nitrate, du lactate ou de l'acétate d'ammoniaque, et, pour des besoins spéciaux, par de l'asparagine ou de l'urée.

Liquide de Naegeli n° 2.

Eau	100 grammes.
Peptone ou albumine soluble	1 gramme.
Phosphate bipotassique	0gr,2
Sulfate de magnésie	0gr,04
Chlorure de calcium	0gr,02

Liquide de Naegeli n° 3.

Eau	100 grammes.
Sucre de canne	3 —

(1) Cohn, Untersuchungen über Bacterien (*Cohn's Beitr. zür Biol. der Pflanzen*, I, 2e p.).

(2) Mayer, Untersuchungen über die alkoolische Gährung, 1869.

(3) Naegeli, Untersuchungen über niederen Pilze, 1878.

Tartrate d'ammoniaque	1 gramme.
Phosphate bipotassique	0,gr02
Sulfate de magnésie	0gr,04
Chlorure de calcium	0gr,02

La réaction de ces liquides doit être essayée ; on peut la modifier à volonté. Le phosphate bipotassique les rend neutres ou alcalins ; pour les avoir acides, on peut les remplacer par du phosphate monobasique.

Le liquide de Raulin, dont il a été parlé plus haut (p. 55), a une composition plus complexe :

Liquide de Raulin.

Eau	1500 grammes.
Sucre candi	70 —
Acide tartrique	4 —
Nitrate d'ammoniaque	4 —
Phosphate d'ammoniaque	0gr,60
Carbonate de potasse	0gr,60
— de magnésie	0gr,40
Sulfate d'ammoniaque	0gr,25
— de zinc	0gr,07
— de fer	0gr,07
Silicate de potasse	0gr,07

Le liquide de Mayer est surtout à employer pour les fermentations des Saccharomycètes.

Liquide de Mayer.

Eau	100 grammes.
Phosphate de potasse	0gr,5
Sulfate de magnésie	0gr,25
Phosphate de chaux	0gr,05
Sucre candi	15 grammes.
Nitrate d'ammoniaque	0gr,75

Le milieu de Gessard sert surtout pour l'étude du *Bacille pyocyanique* et des espèces similaires.

Liquide de Gessard.

Succinate d'ammoniaque	10 grammes.
Phosphate de potasse	0gr,05
Eau	1000 grammes.

Lorsqu'il faut éliminer complètement l'azote du milieu, on peut avoir recours à la formule suivante employée par Winogradsky (1) dans ses recherches sur l'absorption de l'azote de l'air par les microorganismes :

Liquide de Winogradsky.

Eau distillée	1000 grammes.
Phosphate de potasse	1 gramme.
Sulfate de magnésie	0gr,50
Chlorure de sodium	de 0gr,010 à 0gr,020
Sulfate de fer	de 0gr,010 à 0gr,020
— de manganèse	de 0gr,010 à 0gr,020

Ce liquide peut être additionné de 1 à 4 p. 100 de sucre.

(1) Winogradsky, Recherches sur l'assimilation de l'azote libre de l'atmosphère par les microbes (*Arch. des sc. biol. de l'Inst. imp. de méd. exp. de Pétersbourg*, III, 1894).

Ouchinsky (1) préconise beaucoup la formule suivante :

Liquide d'Ouchinsky.

Eau	1000 grammes.
Glycérine	30 à 40 —
Chlorure de sodium	5 à 7 —
— de calcium	0gr,1
Sulfate de magnésie	0gr,2 à 0gr,4
Phosphate bipotassique	2 à 2gr,25
Lactate d'ammoniaque	6 à 7 grammes.
Asparagine	3 à 4 —

Beaucoup de Bactéries pathogènes, entre autres celles de la diphtérie et du tétanos, y poussent aussi bien que dans les bouillons et y gardent la même activité.

Arnaud et Charrin (2) donnent comme très favorable au développement du *Bacille pyocyanique* le milieu suivant, qui peut également convenir à d'autres espèces :

Liquide d'Arnaud et Charrin.

PO^4K^2	0gr,100
$PO^4Na^2 + 12H^2O$	0gr,100
CO^3KH	0gr,134
$CaCl^2$	0gr,050
$MgSO^4 + 7H^2O$	0gr,050
Asparagine cristallisée	5 grammes.
Eau distillée	1 litre.

Le liquide suivant est de composition plus simple:

Liquide de Fraenkel et Voges.

Chlorure de sodium	5 grammes.
Phosphate neutre de soude	2 —
Lactate d'ammoniaque	6 —
Asparagine	4 —
Eau distillée	1000 —

Bien des espèces, saprophytes ou pathogènes, y végètent bien, en particulier le *Bacille de la morve*, le *Colibacille*, le *Bacille pyocyanique*. En ajoutant 5 à 6 p. 100 de glycérine, le *Bacille de la tuberculose* s'y cultive très bien (3).

La *solution de Maassen* peut être employée dans le même but.

Liquide de Maassen.

Neutraliser 100 centimètres cubes d'acide malique à 7 p. 100 avec une solution de potasse à 7 p. 100.

Compléter à 1 litre avec de l'eau et ajouter :

Asparagine	10 grammes.
Sulfate de magnésie	0gr,4
Phosphate bisodique	2 grammes.
Carbonate de soude	2gr,5

Et après dissolution :

Chlorure de calcium	0gr,01

(1) Ouchinsky, Recherches sur la nature des poisons de la diphtérie et du choléra (*Arch. de méd. expér.*, V, 1893, p. 293). — Id : Ueber eine eiweissfreie Nährlösung für pathogene Bakterien (*Centralbl. für Bakt.*, XIV, 1893, p. 316).

(2) Arnaud et Charrin, Recherches cliniques sur les sécrétions microbiennes (*C. R. de l'Acad. des sc.*, 6 avril 1891).

(3) C. Fraenkel, Beiträge zur Kenntniss des Bakterienwachstumes auf eiweissfreien Nährboden (*Hygien. Rundschau*, IV, 1894, p. 769).

Si l'on veut faire intervenir l'urée, on peut se servir de la *solution de Jaksch* :

Liquide de Jaksch.

Eau	1000 grammes.
Sulfate de magnésie	0gr,06
Phosphate acide de potasse	0gr,12
Sel de Seignette	5 grammes.
Urée	5 —

D'après Proskauer et Beck, les liquides suivants peuvent rendre des services pour la culture du *Bacille tuberculeux* :

Liquide n° 1.

Eau	100 grammes.
Asparagine	0gr,5
Acide citrique	0gr,075
Glucose	1 gramme.
Glycérine	4 grammes.
Phosphate de potasse	0gr,5
Sulfate de magnésie	0gr,25
Chlorure de sodium	0gr,15
Sulfate de potasse	0gr,25

Liquide n° 2.

Eau	100 grammes.
Glucose	1 gramme.
Chlorhydrate d'ammoniaque	0gr,1.
Glycérine	4 grammes.
Chlorure de sodium	0gr,5

Liquide n° 3.

Eau	100 grammes.
Carbonate d'ammoniaque	0gr,35
Phosphate monopotassique	0gr,15
Sulfate de magnésie	0gr,25
Glycérine	1gr,5

Bordas et Joulin (1) proposent, sous le nom de *lacto-sérum*, le milieu suivant, qui jouirait des mêmes propriétés culturales que le lait :

Lacto-sérum artificiel.

Lactose	55 grammes.
Albumine d'œuf pulvérisée	18 —
Chlorure de sodium	0gr,60
Eau distillée	1000 gramme .

Neutraliser à la soude jusqu'à réaction nettement alcaline, filtrer dans des tubes à essai et stériliser à l'autoclave à 110° pendant dix minutes en disposant les tubes sur un lit d'ouate, pour éviter un échauffement trop brusque pouvant faire brunir la solution alcaline de lactose.

Il est du reste facile pour l'expérimentateur de modifier la composition de tels liquides suivant les besoins ou les indications de l'expérience.

Les *liqueurs minérales* sont, d'une façon générale, peu propices au développement des Bactéries. Elles sont bien plus propres à nourrir des Champignons plus élevés, les Levures et les Moisissures par

(1) Bordas et Joulin, Sur le développement des microorganismes sur le lacto-sérum artificiel (*Soc. de Biol.*, 9 janvier 1897).

exemple. Beaucoup de nos espèces ne peuvent pas y vivre ; toutes y vivent mal. Dans des cas particuliers, cependant, de tels milieux nutritifs, de composition chimique constante et bien connue, peuvent rendre de grands services pour l'étude physiologique de certains types. C'est en s'en servant que l'on arrive au mieux à se rendre compte et des modifications que l'espèce fait subir à la composition chimique du milieu, et de l'influence que certaines substances peuvent avoir sur la vitalité de l'espèce. Nous avons vu précédemment (p. 55) à quels résultats curieux est arrivé Raulin, en étudiant les conditions de développement d'une Moisissure, l'*Aspergillus niger*, dans les solutions purement minérales.

MILIEUX LIQUIDES VÉGÉTAUX

On a préconisé les macérations, les infusions et les décoctions de plantes. L'eau de foin est, parmi les nombreux liquides de cette nature dont on fait usage, celle qui a joui d'une plus grande faveur. On ne saurait, à moins de raisons spéciales, recommander l'emploi de ces milieux dont les qualités nutritives sont en général très faibles. Leur préparation est du reste facile. Les plantes ou parties de plantes sont coupées en morceaux et mises à macérer, à infuser ou à décocter, selon le cas. Le liquide est neutralisé à l'aide d'une solution saturée de bicarbonate de soude, puis filtré. Il est prêt à être soumis aux opérations.

Les *jus* ou *sucs* végétaux sont traités de la même façon. Leur usage est encore plus restreint.

Infusion de foin ou de paille. — Quinze ou vingt grammes de foin ou de paille, coupés en petits morceaux, sont traités par un litre d'eau bouillante ; le tout est laissé à infuser pendant une demi-heure. On filtre et l'on neutralise à la soude ou l'on acidifie avec un peu d'acide tartrique selon les besoins. On stérilise à l'autoclave.

Décoctions végétales. — On fait bouillir le produit dans l'eau pendant une demi-heure à une heure et l'on traite le liquide filtré comme il est nécessaire.

Eau de Levure. — On fait bouillir 100 grammes de Levure de bière dans un litre d'eau ; on filtre, neutralise et stérilise à l'autoclave.

Eau de malt. — On délaye dans un litre d'eau 100 grammes de malt broyé. On maintient le mélange de 55° à 58° pendant une heure, sans dépasser 58° pour ne pas détruire la diastase. Il se forme un vrai moût de bière. Après ce temps, on porte à l'ébullition, puis on filtre et stérilise à l'autoclave.

Eau de touraillons. — Les touraillons sont les plantules et les radicelles de l'orge germée que l'on sépare du malt ; 100 grammes de touraillons sont mis à macérer pendant deux heures dans un litre d'eau. On fait bouillir quelques minutes ; on filtre et l'on stérilise à l'autoclave.

Roux (de Lyon) (1) recommande tout spécialement ce milieu, qui se montrerait souvent supérieur aux bouillons de viande. Il est des espèces, certains Streptocoques pathogènes entre autres, qui, se développant péniblement sur les milieux les plus habituels, donnent une abondante végétation sur les milieux au touraillon.

(1) Roux, Emploi du touraillon pour la culture des Bactéries (*Soc. de Biol.*, 13 juillet 1889).

MILIEUX LIQUIDES ANIMAUX

Les plus importants de ces milieux artificiels sont sans contredit les bouillons de viande. Ce sont ceux que l'on emploie de beaucoup le plus couramment. Malgré certaines incertitudes forcées dans leur composition, provenant de causes qui ont été exposées plus haut (p. 223), c'est encore à eux qu'on aura recours le plus souvent parce qu'ils donneront les meilleurs résultats.

Bouillon de viande peptonisé. — Le bouillon de viande est sans contredit le liquide nutritif à préférer. Il se fait d'habitude avec les viandes de bœuf, de veau, de cheval, de volaille, de poisson; les bouillons faits avec la viande de veau paraissent les plus propres au développement microbien ; la viande de cheval donne d'aussi bons résultats que celle de bœuf. Les morceaux assez finement découpés sont mis à décocter sur un feu doux, dans une quantité d'eau qui est d'habitude de 1 litre par livre de chair. On écume soigneusement, après quelques bouillons, et l'on maintient en ébullition pendant cinq heures. A la fin de l'ébullition, on ajoute la proportion de peptones voulue, 1 p. 100 de l'eau employée. On ramène aux proportions indiquées, en ajoutant de l'eau. Après refroidissement, on dégraisse en enlevant d'abord la graisse qui s'est figée à la surface, soit en siphonnant le liquide clair, puis on filtre sur papier mouillé, on neutralise à l'aide de la solution saturée de bicarbonate de soude ou de soude caustique, en faisant bouillir à nouveau. On recommande souvent d'ajouter 6 à 8 grammes de sel par litre ; d'après Miquel (1), le bouillon salé est plus propre à la culture des Bactéries, ce qui est loin d'être prouvé. Cette addition de sel doit se faire, d'après Benoist (2), après la neutralisation et la filtration, pour éviter la formation d'un nouveau précipité. On peut donner des qualités spéciales à ces bouillons en leur ajoutant une petite quantité de glucose et de glycérine, de 1 à 2 p. 100 ou plus de chacune de ces deux substances.

Le bouillon est ensuite porté à 120° dans l'autoclave. Il se trouble souvent à chaud, par suite d'une précipitation de phosphates moins solubles à chaud qu'à froid, mais reprend sa limpidité par le refroidissement.

Le procédé suivant peut aussi être employé. On prend de la viande de bœuf aussi fraîchement tué que possible, encore chaude même s'il est possible, pour éviter l'acidité que détermine toujours une légère altération. Cette viande finement hachée est mise dans un ballon avec une fois et demie son poids d'eau et 1 gramme de peptones pour 100 de liquide, puis le tout porté à 120° pendant vingt minutes dans l'autoclave. Le bouillon obtenu est à peu près neutre ; la faible acidité est combattue avec de la soude caustique en solution. On filtre sur filtre mouillé et l'on stérilise à une température qui ne doit pas dépasser 110°.

Avant de répartir le bouillon dans les vases où l'on doit le conserver et le faire servir, il est à recommander de lui faire subir, en bloc, l'action de l'autoclave ou du stérilisateur pendant quelque temps. Fréquemment, en effet, les bouillons, obtenus comme il vient d'être dit, se troublent

(1) MIQUEL, Les organismes vivants de l'atmosphère. Thèse de Paris, 1882.

(2) BENOIST, Préparation de quelques milieux nutritifs destinés à l'étude des Bactéries (*Ann. de micr.*, 1888, p. 75).

de 100° à 120°. Une nouvelle filtration est alors nécessaire. Il est à remarquer que les bouillons mal dégraissés, ou qui n'ont pas subi une ébullition après la neutralisation, restent souvent opalescents et continuent à précipiter, même longtemps après leur fabrication. Ce précipité paraît être constitué souvent par du phosphate de chaux, d'autres fois par de la graisse émulsionnée ou en partie saponifiée.

Procédés recommandés. — Il est plus simple et certainement au moins aussi avantageux d'adopter la manière de faire suivante, qui donne un excellent bouillon employé depuis longtemps au laboratoire de Koch, à Berlin, sous le nom de *Fleisch-infus-pepton*, mot qu'on peut traduire par *macération de viande peptonisée.*

1° Cinq cents grammes de viande dégraissée sont hachés et mis à macérer à basse température, pendant vingt-quatre heures, dans un litre d'eau ;

2° On passe et exprime dans un linge et, au besoin, on ramène au volume de 1 litre ;

3° On chauffe jusqu'à ébullition et l'on fait dissoudre de 10 à 20 grammes de peptones sèches pour 1 litre ;

4° On filtre sur un filtre mouillé pour enlever la graisse ;

5° On alcalinise, jusqu'à réaction alcaline légère, mais nette ;

6° On chauffe à l'autoclave à 120° pendant un quart d'heure, puis on filtre à chaud ;

7° On remplit les récipients voulus et l'on stérilise à l'autoclave.

Dans le cours des opérations employées pour préparer ces bouillons, on peut être amené à ajouter d'autres substances, dans un but déterminé, des sucres, de la glycérine, etc. Ces additions ne font rien changer à la technique indiquée.

On obtient de très bons résultats, surtout pour l'obtention des produits toxiques du Bacille de la diphtérie et d'autres espèces pathogènes, avec le bouillon préparé avec l'estomac de porc, suivant les indications de Martin (1), désigné aussi sous les noms de *bouillon de panse*, *bouillon d'estomac de porc*, *bouillon Martin.*

Pour l'obtenir, on prend des estomacs de porc bien nettoyés et l'on broie ou hache assez finement les tuniques muqueuse et musculaire. Pour éviter les variations de teneur en pepsine provenant de causes individuelles, il est bon d'opérer sur plusieurs estomacs à la fois, quatre ou cinq par exemple.

Le hachis obtenu est mis à macérer de douze à vingt-quatre heures, vers 50°, dans de l'eau acidulée, dans les proportions suivantes :

Hachis d'estomac de porc	200 grammes.
Acide chlorhydrique	10 —
Eau	1000 —

On peut avec avantage ajouter des morceaux d'organes, poumons, intestins, muscles ; la quantité de pepsine présente est suffisante pour qu'il y ait profit à le faire.

Après le temps voulu, on chauffe à 100° pendant quelques minutes pour détruire la pepsine en excès, on filtre et l'on alcalinise au moment où le liquide atteint environ 80°. On filtre sur papier ; on chauffe

(1) MARTIN, Production de la toxine diphtérique (*Ann. de l'Inst. Pasteur*, XII, 1898, p. 26).

à 120° ; on filtre à nouveau et l'on répartit dans des ballons qui seront stérilisés à 115° pendant un quart d'heure.

D'un autre côté, on hache 500 grammes de viande de veau qu'on fait macérer pendant vingt heures à 35° dans un litre d'eau ; on exprime fortement et l'on ajoute 5 grammes de sel. On mélange le liquide obtenu avec parties égales du bouillon de panse de la première préparation, on chauffe à 70° pour coaguler les albuminoïdes et l'on alcalinise en ajoutant, par litre, 7 centimètres cubes de solution normale de soude (1). On filtre sur papier et l'on stérilise par trois chauffages répétés à 100° ou, mieux, par filtration sur bougie Chamberland.

Bouillon de peptones. — Des peptones de bonne qualité donnent des solutions d'excellent usage et très commodes à préparer. On peut recommander la méthode suivante : on dissout des peptones sèches dans l'eau bouillante en proportion de 1 à 2 grammes pour 100 d'eau. On prend la réaction au papier de tournesol. Si elle est acide, ce qui arrive avec beaucoup de peptones, on ajoute goutte à goutte de la solution de soude caustique jusqu'à réaction *très légèrement alcaline*. Le liquide est filtré et stérilisé. Il se maintient indéfiniment clair et paraît parfaitement convenir au développement des différentes espèces de Bactéries ; il est toujours plus fortement coloré que le bouillon de viande et brunit même parfois à l'autoclave. Il est nécessaire de veiller de très près à la qualité des peptones à employer; leur valeur nutritive est excessivement variable, parfois très faible. Les résultats obtenus avec une marque peuvent souvent manquer avec une autre. On doit employer de préférence celles que la pratique montre donner de bons résultats. Les plus usitées sont celles de Chapoteaut, de Chassaing, de Collas, de Witte.

Pour des besoins particuliers, on peut ajouter aux peptones 1 p. 100 de glucose, de lactose, d'un autre sucre, ou de glycérine ; mais il faut savoir que l'addition de sucres peut modifier l'attaque des peptones par les microbes ; en particulier, comme l'a montré Péré (2), les sucres s'opposent à la formation d'indol, la transformation de la peptone étant alors moins complète ; il peut en être de même des nitrates, pour le Colibacille par exemple.

Aux bouillons additionnés de lactose, glucose ou d'autres sucres, on peut ajouter environ 2 p. 100 de carbonate de chaux en poudre pour obtenir le *bouillon carbonaté*. Si l'attaque du sucre se produit, l'acide formé, agissant sur le carbonate, met en liberté de l'acide carbonique qui se dégage en petites bulles gazeuses.

Bouillon d'extrait de viande. — On le prépare en faisant dissoudre de l'extrait de viande de Liebig ou autre dans l'eau bouillante, en proportion de 5 grammes d'extrait pour 100 d'eau. Après solution, on essaie au papier de tournesol, neutralise au besoin par le bicarbonate de soude et l'on filtre. Le liquide obtenu est d'une belle couleur jaune rougeâtre assez foncée. Il se décolore en vieillissant et devient jaune. On peut le rendre plus nutritif en ajoutant 1 p. 100 de glucose.

Le bouillon d'extrait de viande n'est qu'un aliment médiocre pour les

(1) La *solution normale de soude* renferme par litre d'eau 40 grammes de soude caustique pure, correspondant à 23 grammes de sodium.

(2) Péré, Contribution à l'étude du *Bacterium coli* et du Bacille typhique (*Ann. de l'Inst. Pasteur*, VI, 1892, p. 512).

Bactéries, dont le développement ne s'y fait jamais aussi abondamment, à beaucoup près, que dans les bouillons préparés avec de la viande. De plus, il est d'une stérilisation difficile ; il précipite souvent plusieurs fois de suite lorsqu'il est porté à une température de 105°, ce qui en complique singulièrement l'emploi.

LIQUIDES DE L'ORGANISME

Les espèces parasites ne trouvent dans les meilleurs bouillons que des conditions de nutrition d'une ressemblance un peu lointaine avec celles qui favorisent leur développement dans l'organisme. Elles s'y développent mal, quelques-unes même pas du tout. On a donc songé à utiliser comme milieu de culture, soit le milieu où elles se trouvent, soit des parties équivalentes.

Le sang, le sérum du sang, l'urine, le lait, les œufs sont, de ces milieux, ceux auxquels on a le plus souvent recours. Plus exceptionnellement, on emploie l'humeur aqueuse, ou des liquides pathologiques, les sérosités de la plèvre, de l'ascite, de l'hydrocèle, le pus de certains abcès anciens, amicrobiens, comme certains abcès de nature tuberculeuse.

Sang. — Gilbert et Fournier (1) ont recommandé, pour la culture du Pneumocoque, le *sang défibriné.* Ce milieu renferme de l'hémoglobine dont les modifications de couleur surtout, résultant des réactions de la vie microbienne, peuvent donner des indications utiles. Pour le préparer, on peut recueillir du sang aseptiquement dans des vases spéciaux, dont la paroi interne porte de nombreuses pointes obtenues par le refoulement du verre ; par agitation, la fibrine s'accole en longs filaments à ces pointes, le liquide restant est réparti suivant les besoins. Ou bien, on recueille le sang dans des vases stérilisés renfermant de petites perles de verre ; par agitation, la fibrine s'accole aux perles. On peut encore recueillir le sang en vase ouvert ; on le défibrine à la manière ordinaire par battage, avec un petit balai de jonc, et l'on soumet le liquide restant aux procédés de stérilisation par chauffages répétés qui seront indiqués plus loin.

On peut utiliser le sang rendu incoagulable au moyen de l'action de protéoses, de l'extrait de têtes de sangsues ou de certains sels.

L'utilisation de l'effet des protéoses ne se fait que dans l'animal vivant. On injecte à un chien ou à un chat, avec moins de chances à un lapin, dans les veines, une quantité de solution de peptone Witte à 10 p. 100 dans le liquide physiologique correspondant à 0gr,3 par kilogramme d'animal ; l'injection doit être poussée rapidement. Le sang recueilli finit toujours bien par se coaguler à la longue.

Bosc (2) recommande l'extrait de têtes de sangsues pour rendre le sang incoagulable. Les têtes de sangsues sont placées pendant quelques jours dans l'alcool absolu, puis desséchées et broyées. On fait bouillir la poudre dans autant de fois 2 centimètres cubes d'eau qu'il y a de têtes de sangsues et l'on filtre. Le filtrat est divisé dans une série de tubes stérilisés

(1) Gilbert et Fournier, La culture du Pneumocoque dans le sang défibriné (*Soc. de Biol.*, 11 janvier 1896).

(2) Bosc, Le sang rendu incoagulable comme milieu de culture (*Soc. de Biol.*, 8 décembre 1900).

que l'on porte à 100°-105° pendant vingt minutes. Chaque tube reçoit de 10 à 20 centimètres cubes de sang recueilli aseptiquement. Ou bien on peut injecter dans les veines de l'animal une quantité de filtrat représentant deux têtes de sangsues par kilogramme du poids du corps, puis recueillir directement le sang rendu incoagulable.

On peut aussi s'opposer à la coagulation du sang en lui ajoutant certains sels, en solution, au moment de sa sortie du corps ; on emploie l'oxalate neutre de potasse à la dose de 1 p. 1000 ou le citrate neutre de soude à la dose de 3 p. 1000.

Enfin, on peut mélanger le sang naturel, dès sa sortie du corps, à d'autres milieux, gélose, bouillon, etc., en petite quantité, une partie pour trois, ou l'étaler simplement à la surface, pour obtenir les *milieux sanglants* dont l'emploi est si précieux pour la culture de certains microbes pathogènes.

L'addition d'hémoglobine, ou de préparations pharmaceutiques à base d'hémoglobine, à ces milieux, réussit souvent aussi dans les mêmes conditions et offre de plus grandes facilités d'exécution.

Sérum. — Le sérum sanguin a été pendant quelque temps le seul milieu où pouvaient se développer certaines Bactéries pathogènes. Son emploi était donc d'une nécessité absolue pour l'étude de ces espèces ; l'importance a été toutefois considérablement restreinte à ce point de vue depuis qu'on a observé que ces mêmes espèces se développaient encore mieux sur d'autres milieux ordinaires légèrement modifiés.

Pour obtenir du sérum, on peut très avantageusement avoir recours à la méthode suivie depuis longtemps dans les laboratoires de Pasteur qui permet de l'avoir d'emblée pur de tout germe vivant. Dans la séance du 20 avril 1863, Pasteur a présenté à l'Académie des sciences du sang et de l'urine prélevés aseptiquement. Cette méthode consiste à recueillir *avec pureté* du sang *pur* chez un animal *sain* ; après vingt-quatre ou quarante-huit heures, du sérum *pur* se sépare, à la suite de la rétraction du caillot. La chose est relativement facile à réaliser en s'adressant à un grand animal, cheval, bœuf ou vache ; plus délicate déjà pour le mouton ou le chien, elle demande des précautions assez minutieuses pour des animaux de petite taille, le lapin, le cobaye, la poule, à cause de la faible dimension des vaisseaux. D'une façon générale, le sérum des différentes espèces animales paraît également convenir pour la culture des Bactéries ; on a donc intérêt ici à s'adresser à l'animal qui offre le plus de commodités pour l'opération. Cet animal est sans contredit le cheval, et ceci pour plusieurs raisons. On peut d'abord obtenir d'un seul coup une forte quantité de sang ; un cheval vigoureux de taille moyenne supporte facilement une saignée de 6 litres ; en ne lui prenant que 4 litres de sang, la soustraction passe pour ainsi dire inaperçue. On puise très facilement le sang dans la veine jugulaire qui a un fort calibre et se trouve au cou, dans une assez grande longueur, située immédiatement sous la peau ; les plaies veineuses sont, en plus, beaucoup moins graves que les plaies artérielles. Enfin le sang de cheval donne un caillot beaucoup plus beau, et, par conséquent, plus de sérum que le sang de bœuf ou de veau par exemple. Il est en outre très facile de se procurer des chevaux pour la saignée, dans les villes où il existe des boucheries chevalines au moins ; les bouchers prêtent très volontiers pour cet usage des chevaux destinés à être abattus peu de temps après. D'ailleurs, une

saignée de quelque importance déjà, 5 ou 6 litres de sang, passe tout à fait inaperçue chez un cheval bien portant.

Pour ces diverses raisons, et en outre à cause de l'importance que prend cette opération sur le cheval depuis les remarquables travaux de Roux sur la sérothérapie, il est bon de décrire cette opération sur le cheval avec quelques détails.

L'animal doit d'abord être solidement maintenu, tant pour ne pas nuire à l'opérateur ou à ses aides que pour ne pas compromettre les résultats de l'opération. Le simple tord-nez suffit d'ordinaire, lorsqu'il est tenu par une main ferme ; les chevaux difficiles peuvent exiger l'emploi d'entraves ou même l'usage de l'appareil à contention connu sous le nom de *travail*. Une compression manuelle ou à l'aide d'une pelote, pratiquée à la base du cou, à l'endroit où la jugulaire entre dans le thorax, fait gonfler la veine qui apparaît alors vers le milieu du cou dans la gouttière jugulaire sous forme d'un cordon cylindrique, fluctuant ; elle a là la

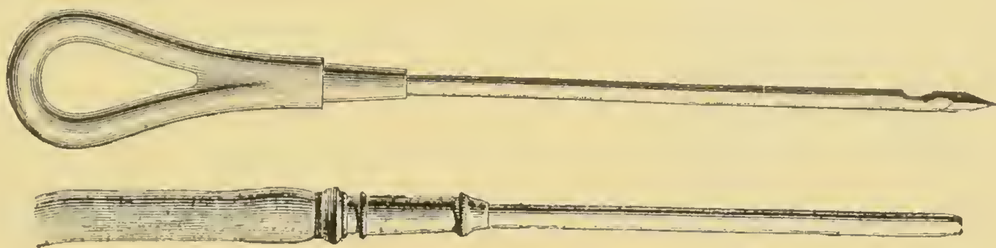


Fig. 87 et 88. — Trocarts Roux.

grosseur d'un fort doigt. A cet endroit la peau est rasée avec soin sur un large espace de 8 à 10 centimètres de diamètre. Cette place est d'abord savonnée, rincée à l'eau bouillie, puis lavée à fond à la liqueur de Van Swieten. A l'aide d'un bistouri stérilisé, l'opérateur fait sur la veine en saillie une incision de 3 centimètres environ. Après avoir incisé la peau avec précautions, il aperçoit la veine sous une mince couche de tissu conjonctif ; il doit respecter cette mince enveloppe qui protège la paroi veineuse contre la chute de Bactéries en suspension dans l'air qui pourraient être entraînées lors de la ponction et souiller alors le sang que l'on veut obtenir. La petite plaie est lavée avec grand soin au sublimé ; le moment est arrivé pour la ponction du vaisseau. En raison des grandes dimensions du vaisseau, on peut user d'un trocart de fort calibre. Ce trocart et sa canule doivent naturellement être dûment stérilisés à l'autoclave ou par une ébullition d'une quinzaine de minutes dans l'eau. Le modèle de Roux et Nocard figuré ci-dessus (fig. 87 et 88) est d'un emploi très commode. L'opérateur tenant le trocart entré dans la canule comme une plume à écrire, le fait pénétrer dans la mince couche conjonctive qui recouvre la veine en lui donnant une direction parallèle au vaisseau ; dès que l'instrument a pénétré d'un demi-centimètre environ, il le dirige obliquement sur la paroi du vaisseau et le fait pénétrer d'un coup sec dans sa cavité. Si l'opération est réussie, la canule entre facilement sur une partie de sa longueur.

En retirant le trocart, on voit jaillir le sang par l'orifice supérieur de la canule. Il ne reste plus qu'à mettre la canule en communication avec les vases destinés à recueillir le sang : ceci se fait facilement à l'aide d'un tube de caoutchouc muni d'un embout spécial, s'adaptant à l'orifice

supérieur de la canule et terminé par un tube de verre destiné à pénétrer dans le vase; le tube et les ajutages sont stérilisés à l'autoclave à l'avance. Les vases destinés à recevoir le sang doivent être de contenance en rapport avec les besoins; pour les provisions de sérum, ils peuvent contenir plusieurs litres. La forme des vases importe pour la rétraction du caillot: les flacons cylindriques conviennent moins que les flacons dits *d'Erlenmeyer*, où le caillot se rétracte mieux et donne, par conséquent, plus de sérum. Ces vases doivent être dûment stérilisés avant de recevoir le sang. Il vaut mieux les stériliser à l'autoclave encore humides qu'à la chaleur sèche; la chaleur sèche rend en effet souvent le verre dur au toucher, comme écailleux, ce qui peut provoquer l'adhérence du caillot au vase et nuire à sa rétraction parfaite. L'orifice en a préalablement été fermé par un tampon d'ouate ou, mieux, coiffé avec un papier un peu résistant; le col est recouvert d'un cornet protecteur de papier brouillard blanc (fig. 89). Au moment voulu, lorsque le sang peut couler par le tube de verre qui termine le caoutchouc réuni à la canule, un aide enlève le cornet de papier brouillard. L'opérateur, sans laisser couler le sang, perce la coiffe de papier avec l'extrémité du tube de verre d'un orifice aussi petit que possible, enfonce le tube dans le flacon et peut alors laisser couler le sang jusqu'au niveau voulu, jusqu'au remplissage presque complet s'il le désire. Dans les flacons bien remplis, la rétraction du caillot paraît se faire plus régulièrement. Pendant ce temps, le vase doit être tenu incliné de façon à éviter la chute des poussières atmosphériques sur la petite ouverture faite au papier. Si le flacon est fermé par un tampon d'ouate, ce dernier est enlevé avec une pince flambée, le flacon étant toujours tenu oblique, le tube de verre est introduit, puis le tampon remplacé pendant la durée de l'opération. Le sang ainsi recueilli se coagule d'ordinaire très vite; quelques minutes après, il est déjà souvent pris en gelée. Au bout de vingt-quatre à trente-six heures, le caillot s'est rétracté et a séparé un sérum transparent de

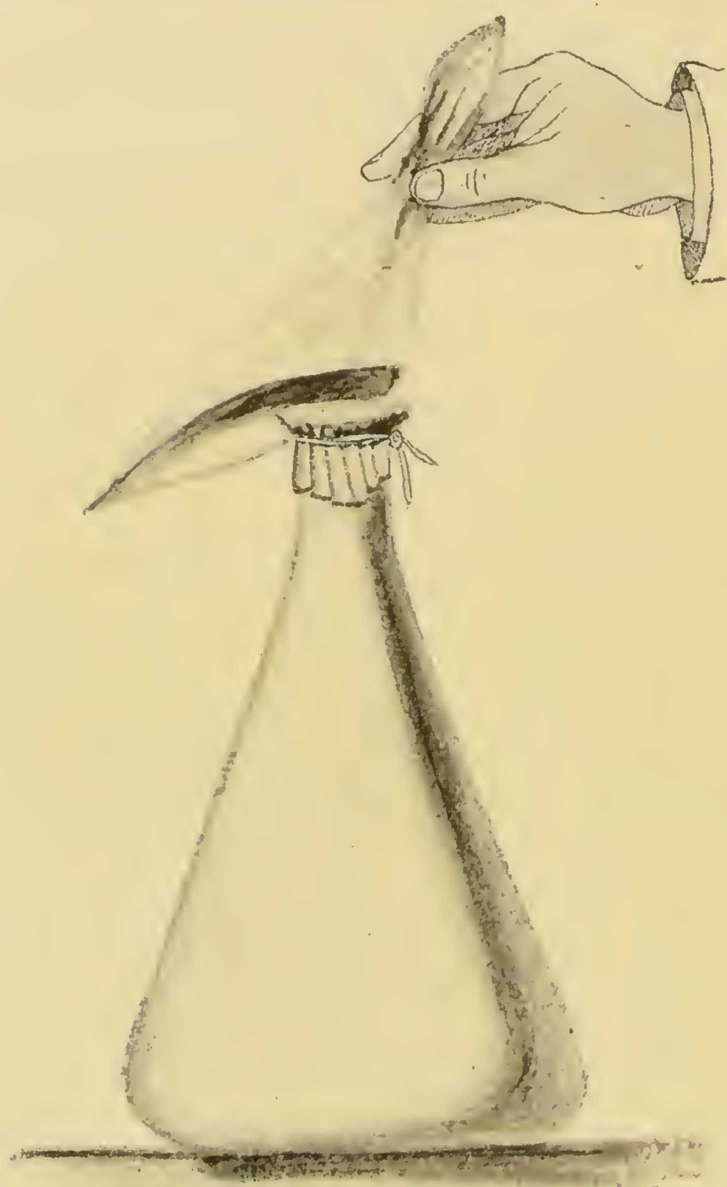


Fig. 89. — Flacon d'Erlenmeyer préparé pour recueillir le sang.

couleur ambrée que l'on aspire avec des pipettes Chamberland stérilisées pour le répartir dans les récipients divers où l'on veut faire les cultures, qui, eux aussi, ont été stérilisés d'avance.

Si l'on s'adresse à de plus petits animaux, le chien par exemple, il faut légèrement modifier la technique opératoire. Il faut naturellement user d'un trocart plus petit. Il n'est plus guère possible d'entrer d'autorité dans la veine dont le calibre est trop petit. Il faut isoler le vaisseau par une dissection minutieuse, le placer sur une sonde cannelée, y faire une petite incision avec toutes les précautions antiseptiques voulues et introduire la canule par cet orifice. Des animaux de cette taille ne peuvent donner qu'une petite quantité de sang ; un chien ne supporte guère facilement la soustraction de plus de 300 centimètres cubes de sang. Si l'on en veut plus, il faut alors s'adresser à la carotide et saigner l'animal à blanc ; la mort s'ensuit fatalement.

La prise du sang de très petits animaux, lapins, cobayes, poules, est plus difficile encore. Il faut introduire dans un gros vaisseau ou dans le cœur, préalablement mis à nu, la pointe effilée et tranchante d'une petite pipette de verre stérilisée et aspirer par l'autre orifice muni d'un tampon d'ouate ; ou bien mettre à nu un vaisseau, la veine jugulaire ou la carotide par exemple, au moyen d'une dissection appropriée (Voy. plus loin : *Expérimentation sur les animaux*), puis piquer obliquement avec l'aiguille bien tranchante d'une seringue stérilisée et aspirer lentement avec la seringue. Chez le lapin, l'opération se fait plus aisément sur une veine de l'oreille, rendue turgescente par une pression exercée à la base de l'organe. On doit auparavant raser les poils sur un petit espace et laver avec soin comme il sera dit plus loin.

Pour une prise d'une petite quantité de sang, on peut simplement se servir d'une seringue stérilisée dont on introduit la canule dans le vaisseau.

Pour récolter de petites quantités de sérum, on peut avantageusement se servir des pipettes et flacons spéciaux imaginés par Latapie (1). Poujol (2) a donné la disposition d'un appareil de grande contenance permettant de recueillir un maximum de sérum d'une masse de sang de 3 à 4 litres.

Lorsqu'on ne peut pas prendre le sang sur l'animal de la façon qui vient d'être indiquée et qu'on est forcé, pour obtenir du sérum, d'utiliser le sang tel qu'il est livré à l'abattoir, c'est-à-dire ayant eu à subir des chances nombreuses de contamination, il faut mettre en œuvre des procédés spéciaux. On recueille dans des vases stérilisés le sang donné par un animal qu'on égorge et on le laisse se coaguler dans un endroit frais. On en soutire le sérum lorsque la rétraction du caillot s'est opérée. Mais ici ce sérum a beaucoup de chances de contenir des germes provenant de la peau de l'animal, des poussières de l'air, des diverses manipulations ; il est nécessaire de les faire périr ou de les séparer, si l'on veut éviter l'altération du milieu et le faire servir à des cultures pures. Les procédés à mettre en œuvre pour arriver à ce but seront exposés plus loin en parlant de la *stérilisation* des milieux de cultures.

Bien qu'on ne remarque guère de différence dans l'emploi, pour les

(1) Latapie, Appareils à récolter le sérum sanguin (*Ann. de l'Inst. Pasteur*, XIV, 1900, p. 106).

(2) Poujol, Un procédé de récolte et de répartition applicable aux grandes quantités de sérum (*Soc. de Biol.*, 20 avril 1901).

cultures, du sérum provenant de différentes espèces animales, il peut cependant y avoir intérêt à employer un sérum déterminé. Ainsi, d'après Bumm (1), le *Micrococcus gonorrheæ* ne pourrait se développer bien que sur le *sérum humain*. Il recommande, pour l'obtenir, la méthode suivante. Aussitôt après la section du cordon, quand le gâteau placentaire est encore dans la matrice, on recueille le sang qui s'écoule. On en obtient de 40 à 60 centimètres cubes d'ordinaire. Le vase qui le contient est laissé en repos de dix-huit à vingt-quatre heures ; la coagulation se fait. On recueille de 16 à 20 centimètres cubes de sérum parfaitement clair par placenta.

Recueilli de cette manière, il faut naturellement le soumettre à la stérilisation. On peut aussi chercher à le recueillir aseptiquement. Pour cela, on peut suivre la marche suivante. Aussitôt la ligature du cordon faite, on met une pince à pression à 3 ou 4 centimètres au-dessus, puis on sectionne le cordon près de la ligature avec des ciseaux stérilisés ; la surface de section est rapidement stérilisée avec une spatule fortement chauffée. On introduit alors dans l'artère ombilicale, béante, l'effilure d'une pipette Chamberland préalablement chauffée dans la flamme. La pince est enlevée et, par des frictions douces, on provoque quelques contractions utérines. Le sang pénètre dans la pipette et est ensuite versé dans un flacon d'Erlenmeyer, de capacité en rapport avec son volume, puis abandonné au repos jusqu'à rétraction du caillot ; le sérum est soutiré et réparti dans les vases de culture. Ce sérum humain est assez lent à se séparer du caillot et est toujours coloré par de l'hémoglobine qui s'est dissoute.

Sérosités pathologiques. — Les sérosités pathologiques de l'hydrocèle, de la plèvre, du péritoine, peuvent tout aussi bien servir. On leur applique les mêmes procédés pour les recueillir et les mettre en usage. On peut chercher à les recueillir aseptiquement lorsqu'on est sûr qu'elles ne contiennent pas de microbes. Pour recueillir le liquide d'ascite aseptiquement, on nettoie soigneusement la peau de l'abdomen comme il sera dit plus loin et on ponctionne avec un trocart stérilisé muni d'un tube de caoutchouc disposé comme pour la récolte du sang (p. 235). Lorsque ces liquides ont pu être contaminés, on les soumet aux procédés de stérilisation qui seront exposés plus loin. La valeur de ces liquides comme milieu de cultures peut varier dans de larges limites, sans qu'on puisse en trouver la raison ; c'est particulièrement le cas pour le liquide d'ascite.

Comme pour le sang, on peut les employer seuls ou mélangés, par moitié ou moins, à d'autres milieux, la gélose principalement. On utilise surtout la *gélose-ascite* (1 partie de liquide d'ascite et 3 de gélose à 3 p. 100) pour la recherche de certains microbes.

On augmente de beaucoup la puissance nutritive des sérums et sérosités à l'égard des Bactéries, en leur ajoutant une petite quantité de peptones, 1 à 2 p. 100. Ces peptones sont ajoutées dissoutes dans le moins d'eau possible et leur solution est stérilisée d'avance, surtout quand elle doit être mêlée à des liquides déjà purs.

Urine. — L'urine a été fréquemment employée autrefois comme liquide de culture. On peut la prendre après la miction et la soumettre

(1) Bumm, Der Microorganismus der gonorrheischen Schleimhaut Erkrankungen. Wiesbaden, 1885.

aux procédés de stérilisation, pour la dépouiller des germes qui ont pu la contaminer à son passage dans l'air ou à son contact avec la peau toujours riche en Bactéries, même la muqueuse des portions antérieures de l'urètre. Portée à 110°, l'urine acide devient franchement alcaline. Il est souvent préférable de la recueillir *pure*. On prépare un vase terminé par un tube de verre muni d'un robinet. L'appareil est stérilisé en bloc dans l'air chaud. La partie libre du tube est introduite assez avant dans le canal de l'urètre qui a été préalablement lavé par l'émission d'un jet d'urine. L'urine ainsi obtenue peut se conserver sans se putréfier aucunement ; au bout de quelque temps, souvent, elle se colore en brun, mais ne se trouble jamais. Il faut cependant se souvenir qu'obtenue par ce procédé elle a bien des chances de contenir des Bactéries qui se rencontrent encore loin de l'orifice du méat, sur la muqueuse urétrale.

Pasteur s'en est fréquemment servi dans ses premières recherches et en particulier dans ses études sur les ferments de l'urée (1). D'après Miquel (2), l'urine normale est peu putrescible ; l'urine neutralisée à l'aide de soude caustique l'est un peu plus. Elle l'est toutefois moins que le bouillon d'extrait Liebig, que nous savons bien inférieur aux bouillons de viande. Les solutions d'urée donnent les mêmes résultats. Comme l'urée, en solution dans l'eau, se décompose facilement vers 90°, Leube (3) recommande de stériliser séparément l'urée et le liquide à additionner. L'urée sèche supporte facilement 105° pendant une heure.

L'urine et les solutions d'urée ne sont à recommander que pour des recherches spéciales. Il est souvent alors préférable de se servir de bouillon de peptones ou de milieux chimiquement définis, additionnés de la quantité voulue d'urée.

Lait. — Le lait peut être obtenu dépourvu de tous germes, comme les liquides précédents, en enfonçant une canule d'argent stérilisée dans les trayons d'une vache préalablement savonnés et lavés ensuite à l'eau bouillie ou en stérilisant bien le trayon et recueillant le jet dans des vases stérilisés. Il faut cependant se souvenir que des Bactéries peuvent pénétrer assez profondément dans ces canaux ; aussi faut-il éprouver à l'étuve le lait recueilli dans ces conditions, un certain nombre de tubes se modifiant souvent. On trouve plus commode de le prendre tout tiré, sauf à le soumettre aux différents procédés de stérilisation, surtout l'autoclave à 115°, qui, du reste, n'altèrent pas sensiblement sa composition. S'il est un peu acide avant l'emploi, il faut le neutraliser avec très peu de soude.

Les modifications que les microbes font subir au lait peuvent porter ou sur le lactose qui fermente et donne de l'acide lactique, ou sur la caséine qui, sous l'influence de produits diastasiques sécrétés, se coagule et même se peptonise ; la coagulation peut aussi être due à la formation d'acide aux dépens du lactose, acide dont la présence peut être indiquée par l'addition préalable d'un peu de teinture de tournesol.

Nous avons vu précédemment la composition d'un milieu artificiel proposé pour remplacer le lait (p. 228) et remédier surtout à la difficulté

(1) Pasteur et Joubert, Sur la fermentation de l'urine (*C. R. de l'Acad. des sc.*), LXXXIII, 1876).

(2) Miquel, Les organismes vivants de l'atmosphère, p. 194.

(3) Leube, Ueber die ammoniakalische Harngährung (*Virchow's Arch.*, C, 1884, p. 540).

d'observer de minimes modifications de ce liquide, en particulier une légère coagulation.

Le *petit-lait* a été vanté comme milieu de culture servant à différencier certaines espèces. On peut le préparer en coagulant le lait par addition d'un peu d'acide chlorhydrique ; on laisse reposer quelques heures pour laisser le caillot exsuder du liquide qu'on sépare, filtre, neutralise et stérilise à 100°. Pendant la chauffe, il peut encore se précipiter un peu de matière albuminoïde ; on est alors obligé de filtrer et stériliser à nouveau.

Œufs. — On utilise parfois les œufs comme milieu de culture. On peut, après avoir ouvert l'œuf à l'un des pôles avec des pinces flambées, à l'aide de pipettes stérilisées, aspirer séparément le blanc et le jaune qu'on répartit suivant les besoins. On peut aussi faire directement la culture dans l'œuf que l'on a au préalable fortement secoué pour obtenir le mélange du blanc et du jaune ; l'ensemencement se fait par un petit orifice fait à l'un des bouts bien flambé, avec un instrument stérilisé ; le trou est ensuite obturé avec de la cire molle bien chauffée. Il faut se souvenir que les œufs peuvent être infectés, avant la ponte, par des microbes présents dans l'oviducte de la poule, et que la coquille humide se laisse assez facilement traverser par des Moisissures ou des Bactéries.

Enfin, on peut utiliser les œufs cuits durs et coupés en tranches, qui sont stérilisées après coup comme il sera dit ; ou simplement le blanc coupé en morceaux qu'on stérilise également dans les vases que l'on veut employer.

2° *Milieux solides.*

Nous connaissons les avantages de ces milieux et nous allons décrire la préparation de ceux qui sont le plus habituellement employés.

Milieux nutritifs à la gélatine. — Les gelées à base de gélatine ont été introduites dans la pratique des cultures de Bactéries par Klebs et Brefeld. Leur emploi s'est beaucoup généralisé et perfectionné depuis ; on peut dire qu'il forme un des points importants des études bactériologiques.

La gélatine qui sert à confectionner la gelée doit être choisie dans les premières marques de fabriques françaises. La meilleure est celle qui se vend sous les noms de *gélatine extra-fine*, *blanc-manger*, en paquets enveloppés de papier bleu et à étiquette dorée. C'est avec celle-ci que l'on obtient les gelées les plus belles et les plus transparentes ; les qualités inférieures donnent un milieu qui reste presque toujours un peu trouble ou légèrement laiteux, quoi qu'on fasse, et qui supporte mal les températures de stérilisation. La beauté de la gelée n'est du reste pas un caractère essentiel.

La quantité de gélatine qui doit solidifier un poids donné d'eau doit varier suivant les circonstances et surtout suivant la saison. Tandis que pendant la saison froide la proportion de 6 à 10 grammes de gélatine pour 100 grammes d'eau suffit amplement pour donner une gelée très consistante, il faut, pendant les fortes chaleurs de l'été, élever ce poids à 12 ou 15 et même 20 grammes pour 100 grammes d'eau ; il n'est guère à recommander de dépasser 15 grammes ; au-dessus, les caractères culturaux peuvent être modifiés. On concasse les plaquettes de gélatine

et l'on fait fondre les morceaux dans l'eau chauffée au bain-marie; l'emploi du feu nu est à éviter ou au moins demande une grande prudence. Pour augmenter la qualité nutritive du milieu, on ajoute à ce moment de 1 à 2 p. 100 de peptones sèches. En dehors de besoins particuliers, il est à recommander d'éviter d'ajouter des sucres aux milieux à la gélatine, ces composés pouvant empêcher la production de modifications importantes du milieu par certains microbes, en particulier la liquéfaction (1). La gélatine et les peptones donnant une forte réaction acide, on verse peu à peu d'une solution de soude à 40 p. 1000 jusqu'à neutralisation complète ou même jusqu'à réaction très légèrement alcaline. C'est là un point très délicat, sur lequel il faut tout particu-

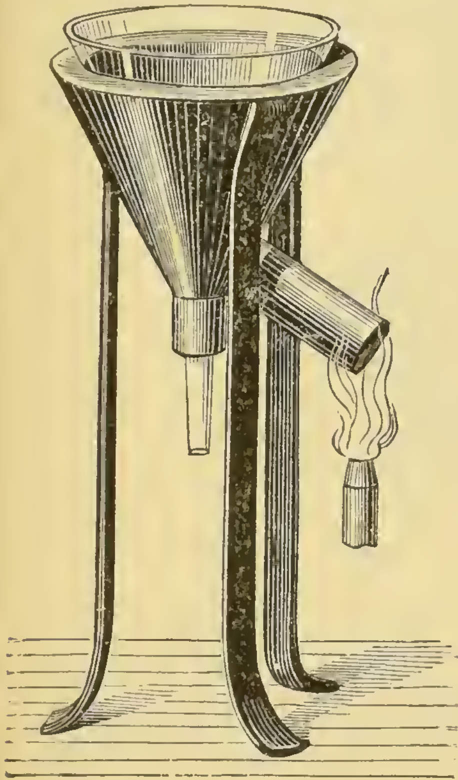


Fig. 90. — Entonnoir bain-marie ordinaire.

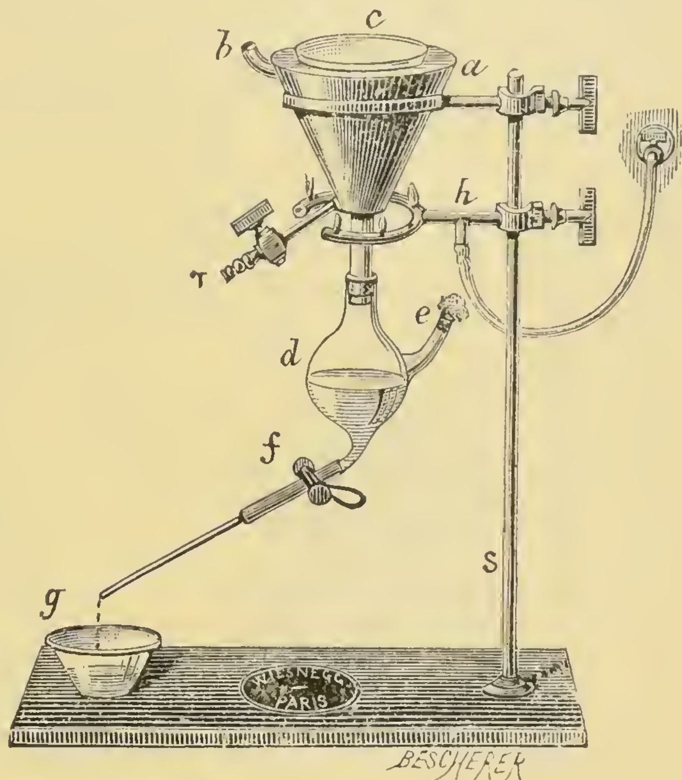


Fig. 91. — Appareil à filtration à chaud.

lièrement porter l'attention. Les Bactéries se développant d'habitude très mal dans les milieux acides, il leur faut des milieux neutres ou alcalins; il faut toutefois éviter un excès même léger; les alcalis libres ont en effet une action nuisible ou retardatrice sur le développement de beaucoup de Bactéries. De plus, la gélatine alcaline supporte moins facilement des températures de 100° et au-dessus; elle peut ne plus se solidifier par refroidissement. On porte le bain-marie à l'ébullition que l'on maintient une dizaine de minutes, pour produire la coagulation de matières albuminoïdes qui pourraient gêner. Suivant la température du local, la filtration peut se faire dans un entonnoir ordinaire ou exiger l'emploi d'un *entonnoir bain-marie*, qui maintient le produit complètement liquide et hâte l'opération. La figure 90 représente l'entonnoir bain-marie ordinaire. C'est un entonnoir en cuivre dans lequel se place un second entonnoir en verre. Entre les deux reste un espace que l'on

(1) AUERBACH, Ueber die Ursache der Hemmung der Gelatineverflüssigung durch Bakterien durch Zuckerzusatz (*Arch. für Hygiene*, XXXI, 1897, p. 311).

remplit d'eau. L'entonnoir en cuivre porte un appendice creux à sa partie inférieure. C'est cette queue que l'on chauffe avec un bec de gaz ou une lampe à alcool. La température de l'eau qui entoure l'entonnoir en verre s'élève très vite ; il faut éviter d'arriver à l'ébullition, à cause des projections qui peuvent se produire.

L'appareil représenté figure 91 est plus compliqué. Il est établi sur le même principe ; le chauffage se fait par la couronne ou la température se maintient par la circulation d'eau chaude, ce qui exige l'emploi d'un bain-marie spécial, en communication avec le tube *b* et le robinet *r*. La gélatine claire tombe dans le réservoir *d* et peut être facilement répartie dans les vases à l'aide du tube que commande la pince à pression *f*. Dans l'appareil figure 92, appareil à filtration à la vapeur, l'entonnoir est chauffé par la vapeur qui parcourt le serpentin qui l'entoure.

La filtration peut du reste se faire bien plus commodément en opérant dans le stérilisateur à vapeur ou dans l'autoclave sans pression.

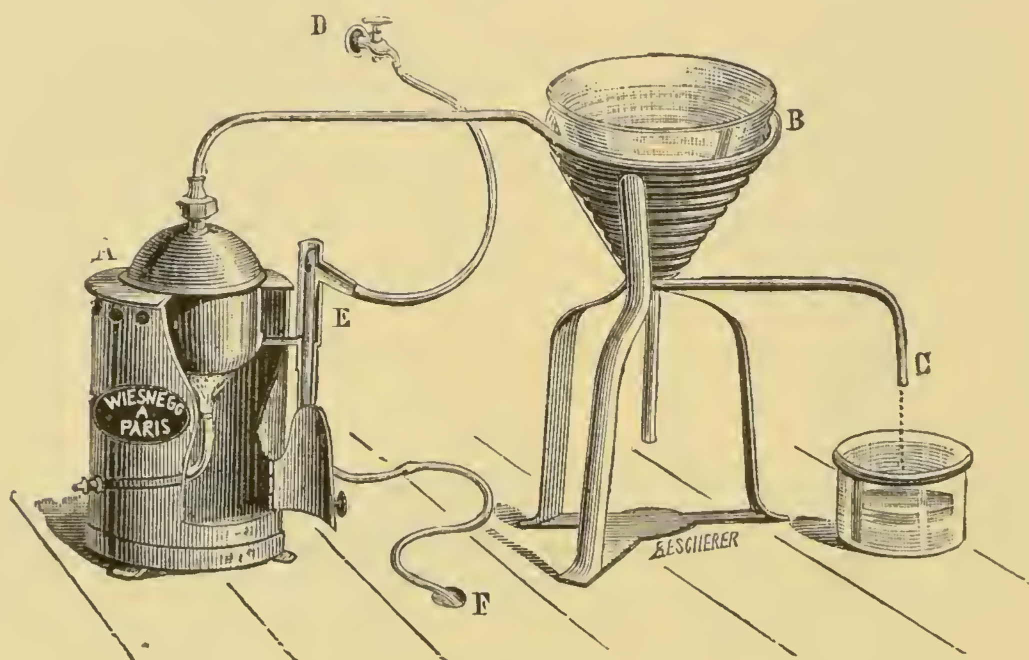


Fig. 92. — Appareil à filtration à la vapeur.

On obtient des gélatines bien plus transparentes en usant d'un collage au blanc d'œuf avant la filtration. On bat du blanc d'œuf en neige avec très peu d'eau, le blanc d'un œuf pour 1 ou 2 litres, et on ajoute à la gélatine après la neutralisation, en ayant soin de la laisser tomber à une température de 60° environ. On agite fortement pour bien opérer le mélange et on porte un quart d'heure à l'autoclave à 115°. La coagulation se fait ; le produit filtre plus facilement et prend une transparence de cristal. Il est nécessaire d'user d'une température aussi élevée pour ne pas laisser dans le milieu des traces d'albumine se coagulant seulement au-dessus de 100°, qui pourraient produire plus tard, si l'on stérilise au-dessus de 100°, du trouble ou de l'opalescence.

Cette gelée, connue sous le nom de *gélatine nutritive*, ou, plutôt, simplement *gélatine*, peut même exiger, pour être limpide, plusieurs filtrations successives. Souvent, elle précipite à nouveau lorsqu'elle est portée à 100° ou 115° pour la stérilisation. Ces précipités sont formés exclusivement de phosphate de chaux ; aussi faut-il éviter, lors-

qu'on veut faire des mélanges plus complexes, de mettre dans ces gelées les phosphates, si favorables cependant au développement des Bactéries.

Au lieu d'ajouter des peptones sèches à la masse, on peut faire dissoudre la gélatine dans les différents bouillons dont la préparation a été indiquée précédemment. On obtient ainsi, avec des bouillons de viande peptonisée ou non, la macération de viande peptonisée surtout (p. 231), une gélatine nutritive d'excellente qualité ; il faut toutefois reconnaître que les gélatines à base de bouillon ou de macération de viande sont beaucoup plus propices au développement des microbes liquéfiants, surtout des *Bacilles fluorescents*, ce qui peut parfois être un inconvénient, dans les analyses d'eaux par exemple, où la liquéfaction totale du milieu survient plus vite qu'avec la gélatine peptonisée simple. La gelée préparée au bouillon de malt ou de touraillon peut être précieuse à employer. On peut également employer dans le même but l'un quelconque des milieux chimiques donnés page 225.

En général, mais surtout lorsqu'on se sert de gélatines de qualité inférieure, il faut éviter, dans ces manipulations, l'emploi du feu nu et une ébullition prolongée, qui pourraient modifier la gelée et la rendre impropre au but que l'on veut remplir. La température de 100° maintenue assez longtemps, surtout en présence d'un léger excès d'alcali, peut modifier le milieu de telle façon qu'il perd la propriété de se prendre en gelée en refroidissant ; la même modification se produit plus facilement encore aux températures élevées de l'autoclave. Le milieu renferme de la *gélatine-peptone*, qui ne se distingue de la gélatine primitive que par l'impossibilité de se sodilifier par abaissement de la température. Ce produit offre beaucoup des réactions des peptones vraies. Le fait est peut-être aussi favorisé par la présence de produits provenant d'altérations antérieures.

La gélatine bien préparée fond à une température qui varie dans des limites très restreintes avec la quantité d'eau qu'elle contient. Les milieux qui contiennent une proportion de gélatine de 6 à 10 p. 100 sont liquides à 25°. On peut prendre 23° comme terme moyen, et encore est-il prudent de régler les étuves où l'on veut placer des cultures sur gélatine pour une température qui ne doit pas dépasser 20°. La légère évaporation d'eau, qui se fait forcément entre le moment de la préparation de la masse et celui où on l'utilise, élève toujours de quelques fractions de degré le point de fusion primitif. Il en est de même de la consistance, qui est en rapport direct avec le point de fusion. Elle est d'autant plus forte qu'il y a plus de gélatine dans la masse, où elle s'élève sensiblement par suite de la dessiccation. Avec de fortes proportions de gélatine, 15 p. 100 et plus, on peut obtenir des gelées supportant 24° sans se liquéfier ; c'est une indication qui peut être précieuse ; toutefois, les gelées dont la teneur dépasse 15 p. 100 ne donnent plus des caractères culturaux aussi nets ; sauf dans les cas spéciaux, il est bon de ne pas dépasser cette dernière proportion.

En se servant de très bonne gélatine et en n'employant pour la stérilisation que des températures de 85° à 90° qu'on fait agir à trois ou quatre reprises, pendant une demi-heure à une heure à vingt-quatre heures d'intervalle chaque fois, on peut obtenir des gelées qui ne se liquéfient qu'à 28°, même 30° et un peu au-dessus, surtout si l'on a soin de les laisser reposer pendant plusieurs jours à une température froide.

C'est la question de chauffage qui semble surtout importer dans cette préparation.

On peut aussi préparer des gelées excellentes à l'aide de jus de viande, de pieds de veau, etc. Elles paraissent même parfois être préférables à la masse obtenue comme nous venons de l'indiquer ; mais la complication du manuel opératoire est loin d'être compensée par la supériorité peu marquée du produit ; ce sont des milieux à réserver pour les cas spéciaux.

Pour des besoins particuliers, on peut ajouter à la gélatine d'autres substances que les peptones.

L'addition de sucres, sucre de canne, glucose ou autres, à 1 ou 2 p. 100, est parfois indiquée. Il faut alors se souvenir que de telles gélatines, comme il a été dit plus haut (p. 241), sont bien moins facilement liquéfiées par les Bactéries liquéfiantes habituelles, fait dû à l'absence ou à la production moindre du ferment protéolytique qui produit cette modification.

Gélatine d'Elsner. — Pour parvenir à différencier le *Colibacille* et le *Bacille typhique*, Elsner (1) préconise l'emploi d'une gélatine au suc de pommes de terre additionné d'iodure de potassium. On prépare ce milieu de la façon suivante : on pile soigneusement 500 grammes de pommes de terre, on les râpe et on les fait macérer pendant trois ou quatre heures dans un litre d'eau ; on tamise la masse et on laisse déposer pendant une nuit. On décante le liquide, on filtre et l'on y fait dissoudre à feu doux de 15 à 20 p. 100 de gélatine. La réaction du produit est très acide ; on lui ajoute de la *solution normale de soude* (2) jusqu'à ce que la réaction ne soit plus que très faiblement, mais cependant encore nettement acide ; suivant le degré d'acidité primitif, il faut de 20 à 30 centimètres cubes de solution alcaline. On filtre, on clarifie au blanc d'œuf et stérilise. Pour l'usage, le milieu est réparti dans des ballons en contenant 100 grammes. Au moment de s'en servir on ajoute, à chaque ballon, 1 gramme d'iodure de potassium, qui se dissout lentement dans la gélatine maintenue fondue. Ou bien on la répartit dans des tubes, par 10 ou 20 centimètres cubes, auxquels on ajoute, au moment de s'en servir, 1 ou 2 centimètres cubes d'une solution stérilisée d'iodure de potassium à 10 p. 100. On ensemence comme pour les cultures sur plaques ordinaires et l'on répartit sur plaques ou, mieux, dans des boîtes de Petri. Très peu d'espèces peuvent pousser sur un tel milieu. Le *Bacille typhique* et le *Colibacille* y végètent bien et il est possible de les différencier aisément à l'aspect des colonies.

D'après Grimbert (3), la réaction du milieu d'Elsner est due à la gélatine. Il serait possible de simplifier la méthode en n'employant que de la gélatine à laquelle on laisse un certain degré d'acidité, l'acidité équivalant à 1 gramme d'acide sulfurique par litre, ce qui correspond à l'emploi de 5 centimètres cubes d'eau de chaux pour neutraliser 10 centimètres cubes de gélatine.

(1) Elsner, Untersuchungen über electives Wachstum der Bacterium coli Arten und des Typhusbacillus und dessen diagnostiche Verwertbarkheit (*Zeitschr. für Hygiene*, XXI, 1895).

(2) La *solution normale de soude* des auteurs allemands renferme par litre d'eau 40 grammes de soude caustique pure, correspondant à 23 grammes de sodium.

(3) Grimbert, Sur la préparation du milieu d'Elsner (*Soc. de Biol.*, 4 juillet 1896).

Il modifie la technique de la façon suivante :

500 grammes de pommes de terre râpées sont mis à macérer, pendant trois ou quatre heures au plus, dans 1 litre d'eau. Le liquide est décanté et filtré, chauffé à l'autoclave pendant dix minutes, pour coaguler les matières albuminoïdes, puis filtré à nouveau. On ajoute 15 p. 100 de gélatine que l'on dissout au bain-marie; on clarifie au blanc d'œuf.

On prend 10 centimètres cubes du milieu que l'on verse dans 50 centimètres cubes d'eau distillée chauffée, et l'on ajoute cinq à six gouttes d'une solution alcoolique de phénolphtaléine; on verse de l'eau de chaux, au moyen d'une burette graduée, jusqu'à ce qu'on obtienne une teinte rose persistante. S'il a fallu employer plus de 5 centimètres cubes d'eau de chaux pour neutraliser les 10 centimètres cubes du milieu, on ajoute à celui-ci maintenu liquide quelques centimètres cubes de solution normale de soude et l'on recommence le titrage. On recommence ainsi jusqu'à ce qu'on arrive à ne plus employer que 5 centimètres cubes d'eau de chaux pour la neutralisation des 10 centimètres cubes employés.

Grimbert (1) propose de remplacer cette gélatine d'Elsner par un milieu artificiel de la composition suivante, basée sur la composition moyenne du jus de pomme de terre :

Eau distillée	1000 grammes.
Maltose	1 gramme.
Amidon soluble	2 grammes.
Asparagine	2 —
Phosphate neutre de potasse	2 —
Sulfate de potasse	2 —
— de magnésie	2 —
Bimalate d'ammoniaque	2 —
Carbonate de magnésie	1 gramme.

On ajoute au milieu 15 p. 100 de gélatine. Au moment de servir, la gelée est additionnée de 1 p. 100 d'iodure ou, mieux, de bromure de potassium.

Remy (2) dit obtenir de meilleurs résultats avec le milieu artificiel suivant, correspondant sensiblement à la composition chimique du suc de pomme de terre, en supprimant la dextrine et le glucose et en substituant le phosphate bisodique au phosphate bipotassique.

Eau distillée	1000 grammes.
Asparagine	6 —
Acide oxalique	$0^{gr},5$
— lactique	$0^{gr},15$
— citrique	$0^{gr},15$
Phosphate bisodique	5 grammes.
Sulfate de magnésie	$2^{gr},50$
— de potasse	$1^{gr},25$
Chlorure de sodium	2 grammes.

Les sels, le sulfate de magnésie excepté, sont broyés dans un mortier, puis introduits dans un matras avec 1 litre d'eau distillée et 30 grammes de peptone Witte ou Grübler. On chauffe à 110° pendant un quart

(1) Grimbert, Sur un milieu d'Elsner artificiel (*Soc. de Biol.*, 25 juillet 1896).

(2) Remy, Contribution à l'étude de la fièvre typhoïde et de son Bacille (*Ann. de l'Inst. Pasteur*, XIV, 1900, p. 555).

d'heure. On verse le contenu bouillant dans un autre matras contenant 120 à 150 grammes de gélatine qu'on fait dissoudre. On ajoute de la soude jusqu'à alcalinisation légère. On chauffe à 110° pendant un quart d'heure. Puis on acidifie avec une solution demi-normale d'acide sulfurique, de telle sorte que 10 centimètres cubes de gélatine aient une acidité telle que celle-ci disparaît par l'addition de 0cc,2 de solution demi-normale de soude, acidité correspondant à 0,5 d'acide sulfurique par litre. On introduit les 2gr,50 de sulfate de magnésie et l'on répartit en tubes de 10 centimètres cubes.

Au moment de l'emploi, on introduit dans chaque tube de gélatine 1 centimètre cube d'une solution de lactose à 35 p. 100 et 0cc,1 d'une solution phéniquée à 2,5 p. 100.

Milieux nutritifs à la gélose. — Les gelées à base de gélatine, malgré leurs incontestables avantages, sont forcément d'un emploi limité. Quelle que soit la quantité de gélatine que l'on y met, la masse fond vers 23° à 24°. D'où impossibilité d'arriver à un beau développement pour beaucoup d'espèces, qui présentent un optimum de végétation à un degré supérieur, et une absence totale de multiplication pour certaines, des pathogènes surtout, qui exigent une température voisine de 37°. De plus, de nombreuses Bactéries liquéfiant très rapidement ces gelées, il peut en résulter des difficultés dans leur diagnose et l'obtention de cultures pures.

Chez certaines plantes, les membranes cellulaires peuvent se transformer, en tout ou en partie, en une substance isomère de la cellulose, qui, dure et cornée à l'état sec, possède la propriété de se gonfler énormément sous l'influence de l'eau, de donner, en absorbant une grande quantité de ce liquide, de la gelée ou du *mucilage*. Les couches ainsi modifiées sont dites *gélifiées* ; elles ne donnent plus les réactions caractéristiques de la cellulose, en particulier elles ne bleuissent plus par l'acide sulfurique et l'iode ou par le chlorure de zinc iodé. Cette transformation des membranes cellulaires en mucilage est fréquente chez les Algues.

Les gelées ainsi produites présentent, entre autres caractères, celui de ne fondre qu'à une température élevée ; un très petit nombre de Bactéries, celles qui s'attaquent à la cellulose, arrivent seules à les liquéfier. A ce double point de vue, elles remplissent les deux desiderata signalés dans l'emploi des masses à la gélatine.

Par contre, pures, elles ne possèdent, leur composition chimique le prouve, que des propriétés nutritives très faibles, pour ne pas dire nulles, tant est restreint le nombre d'espèces qui peuvent se nourrir de cellulose simple ou peu modifiée. Aussi faut-il les additionner de principes nutritifs en proportions assez fortes, ou user, pour les préparer, de bouillons obtenus d'après les formules indiquées précédemment.

Miquel (1) a songé le premier à se servir de ces mucilages végétaux pour les cultures sur milieux solides à une température supérieure à 25°. Il utilisait la gelée formée par le *Chondrus crispus* Lyngb., Algue marine de la famille des *Gigartinées*, ordre des *Floridées*. On la trouve sur les côtes de l'Atlantique, depuis les Açores jusqu'en Norvège. Elle est très employée à la confection de gelées commerciales et connue

(1) Miquel, Septième mémoire sur les organismes microscopiques de l'air et des eaux (*Annuaire de l'Observ. de Montsouris pour 1885*, p. 467).

sous le nom de *Carraghaen* ou *Mousse d'Islande*. Miquel opérait de la façon suivante : 300 grammes d'Algue sont mis à digérer dans 10 litres d'eau bouillante ; on maintient l'ébullition plusieurs heures, puis on passe au tamis. Le liquide est de nouveau porté à l'ébullition et passé à l'étamine dans un entonnoir chaud. La liqueur est évaporée au bain-marie et versée dans des cuvettes de porcelaine où on la fait sécher ; on obtient un résidu dur qui, ajouté au bouillon dans la proportion de 1 p. 100, le transforme par refroidissement en une gelée qui reste solide jusqu'à 45° à 50°. Elle ne fond qu'entre 55° et 60° et supporte facilement une température de 110°.

Puccinelli (1) donne le procédé suivant pour obtenir une belle gelée avec cette même Algue. Six grammes de *Fucus crispus* bien lavés à l'eau sont mis à cuire avec 200 grammes de bouillie de viande neutralisée dans le stérilisateur à vapeur pendant une heure. On filtre sur un filtre simple chauffé ou, mieux, dans un entonnoir bain-marie. On obtient rapidement le liquide nécessaire pour garnir une douzaine de tubes à essai.

On obtient plus facilement des gelées à l'aide d'une Algue des mers des Indes, le *Gelidium spiniforme* Lamx., de l'ordre des *Floridées* également. C'est cette espèce qui forme la majeure partie de la drogue connue sous le nom d'*Agar-Agar* ou *Varech corné*. La matière gélatineuse qu'on en retire a été étudiée, en 1859, par Payen (2), qui lui a donné le nom de *gélose*. C'est une substance amorphe se gonflant et se dissolvant dans l'eau bouillante ; le liquide se prend en gelée par le refroidissement. Elle solidifierait, d'après ce chimiste, environ cinq cents fois son poids d'eau, formant, à poids égal, dix fois plus de gelée que n'en donne la meilleure gélatine. On prépare facilement de belles gelées nutritives, à l'aide de la drogue du commerce, de la façon suivante (3) :

Vingt-cinq grammes du produit commercial, coupés en petits morceaux, sont mis à macérer dans un demi-litre d'eau acidulée d'acide chlorhydrique à 6 p. 100 ; on laisse en contact vingt-quatre heures en remuant à plusieurs reprises. Après plusieurs lavages à grande eau, pour faire disparaître toute trace d'acide, on met l'Algue déjà gonflée dans 400 ou 500 grammes d'eau additionnée de 5 p. 100 d'ammoniaque ; on la retire après un jour et on la lave comme précédemment. Pendant les fortes chaleurs de l'été, il est bon de réduire de moitié le temps de ces deux macérations successives.

On fait alors bouillir à feu nu un litre d'eau distillée et, lorsqu'elle est en pleine ébullition, on y jette l'Algue, qui se dissout immédiatement ou en peu de temps. Cette opération peut également être faite dans l'autoclave, à 110°-115°. Le liquide est essayé au papier de tournesol et neutralisé avec la solution de soude à 10 p. 100. On filtre à chaud, sur un entonnoir bain-marie (fig. 90) ou de préférence dans le stérilisateur à vapeur ou l'autoclave vers 100°, après avoir passé sur une flanelle, ce qui facilite beaucoup la filtration. Le liquide très limpide se prend, par refroidissement, en une belle gelée, opalescente lorsqu'elle est en

(1) Puccinelli, *Bull. della Real Acad. med. di Roma*, XVI, 1890, fasc. V.
(2) Payen, *C. R. de l'Acad. des sc.*, 1859, et Traité de chimie industrielle, II, p. 41.
(3) Macé, Sur la préparation des milieux à la gélose pour la culture des Bactéries (*Ann. de l'Inst. Pasteur*, I, 1887, p. 189).

masse, mais très transparente en plaques ou dans des tubes à réactifs. Hægler (1) supprime la filtration en centrifugeant le liquide; par le refroidissement dans l'appareil, on obtient des masses de gelée dont on sépare au couteau l'extrémité où se sont réunies les particules qui étaient en suspension. On peut aussi clarifier au blanc d'œuf en opérant comme il a été dit pour la gélatine; le mélange doit être fait vers 45°.

La technique qui vient d'être exposée, employant de 2 à 2,5 de gélose p. 100 d'eau ou de bouillon, donne toujours un très beau milieu de consistance suffisante et adhérant très bien aux tubes à essai.

Il est des géloses qui se dissolvent facilement, après un simple gonflement dans l'eau simple ou acidulée, dans l'eau bouillante et permettent de supprimer en partie les manipulations précédentes. D'autres, au contraire, ne donnent de bons résultats qu'avec le traitement complet. La pratique le montrera aisément.

On rend la gelée nutritive en lui ajoutant, avant de la neutraliser et la filtrer, une solution de peptones dans les proportions de 1 à 2 grammes de peptones sèches pour 100 grammes de gelée. On fait dissoudre 10 à 15 grammes de peptones sèches dans 50 grammes d'eau. Le mélange avec la gelée se fait parfaitement à chaud. Ou, encore, on se sert comme liquide de bouillon peptonisé. C'est ce mélange que nous désignerons simplement sous le nom de *gélose*.

On peut aussi remplacer l'eau simple par l'un des liquides nutritifs employés.

L'addition de faibles quantités de glycérine, 1 à 5 p. 100, à la gélose ainsi préparée, lui donne des propriétés nutritives plus énergiques. Nocard et Roux (2) ont conseillé l'emploi de cette *gélose glycérinée* à 5 p. 100 pour les cultures du Bacille de la tuberculose, qui se développe d'une façon luxuriante sur ce milieu. Beaucoup d'autres espèces, d'après des expériences de notre laboratoire, se conduisent de même. La glycérine doit probablement servir directement à la nutrition de la Bactérie; en tout cas, elle modifie favorablement le milieu et conserve en particulier l'humidité et la perméabilité de sa surface. Il est à recommander d'ajouter, dans ce cas, mais seulement lorsque la proportion de glycérine est élevée, au-dessus de 6 p. 100, quelques gouttes d'une solution concentrée de gomme arabique, qui permet à la gelée d'adhérer aux parois des vases de verre; hors ce cas particulier, l'addition de gomme est plutôt à éviter.

En ajoutant de 1 à 2 p. 100 de glucose ou de lactose, on obtient une *gélose glucosée* ou une *gélose lactosée* dont l'usage peut donner de très bons résultats pour certaines espèces.

La consistance de ces masses de gelées varie naturellement avec la proportion d'eau qui entre dans leur composition. On la fait augmenter en diminuant la quantité de liquide. La transparence devient alors moins grande.

La gélose obtenue comme nous l'indiquons ne commence à fondre que vers 70° à 75°; à 80°, elle est visqueuse et ne devient complètement liquide qu'entre 85° et 90°. En employant seulement 1 à 5,5 p. 100

(1) Hægler, Zur Agarbereitung (*Centralbl. für Bakt.*, XVII, 1895, p. 558).

(2) Nocard et Roux, Sur la culture du Bacille de la tuberculose (*Ann. de l'Inst. Pasteur*, I, 1887, p. 20).

de gélose, la gelée obtenue se liquéfie plus tôt, vers 65°. Par refroidissement, ces gelées se solidifient vers 40°.

GÉLOSE AU SANG. — Bezançon et Griffon (1) la recommandent pour la culture du *Bacille de la tuberculose*. Ils donnent la technique suivante : dans des tubes contenant de la gélose glycérinée à 6 p. 100, maintenue fondue au bain-marie, on reçoit aseptiquement une petite quantité de sang au sortir de l'artère de l'animal. On fait aussitôt le mélange en évitant de secouer trop fort le tube, puis on le pose sur un plan incliné pour refroidir. En se refroidissant, la gélose emprisonne le sang et donne un milieu de culture tout spécial. La *gélose sanglante* s'obtient en étalant simplement à la surface de gélose ordinaire quelques gouttes de sang recueilli d'une façon aseptique.

GÉLOSE AUX ALBUMINATES ALCALINS. — Pour éviter la préparation souvent ennuyeuse, au point de vue de la stérilisation surtout, des milieux au sérum sanguin, et en raison des facilités de culture de certaines espèces, Deycke (2) a imaginé de préparer une gélose additionnée d'un albuminate alcalin ; elle est connue sous le nom de *gélose de Deycke*. Il recommande surtout ce milieu pour l'examen bactériologique des angines diphtériques ; les colonies du *Bacille de la diphtérie* s'y développent rapidement, tandis que les autres microbes qui l'accompagnent souvent dans les fausses membranes, principalement le *Streptocoque pyogène*, y poussent mal.

Les *albuminates alcalins* se préparent de la façon suivante : on introduit dans un ballon 1 kilogramme de viande de veau dégraissée et finement hachée ; on ajoute 1 200 centimètres cubes d'une solution de potasse à 3 p. 100 et l'on agite fortement. Le tout est abandonné à l'étuve à 37° pendant quarante-huit heures, puis chauffé au bain-marie à 60°-70° pendant quelques heures ; on filtre ensuite sur papier. Le liquide brun obtenu est additionné avec précaution d'acide chlorhydrique pur qui précipite l'albuminate alcalin. Le précipité est recueilli sur un linge fin et mis en suspension dans de l'eau distillée. On ajoute une solution saturée de soude caustique jusqu'à réaction fortement alcaline. Il se produit une redissolution partielle ; en soumettant le mélange à 100° pendant plusieurs heures dans un stérilisateur à vapeur, tout se dissout. Il faut alors corriger la réaction, qui doit être neutre ou légèrement alcaline. On évapore ce liquide jusqu'à siccité au bain-marie et à l'étuve au-dessous de 100° ; on en obtient une poudre brunâtre qu'on peut dissoudre dans l'eau. Pour obtenir la gelée, on ajoute, pour 100 grammes d'eau, 1 gramme d'albuminates alcalins, 1 gramme de peptone, 0gr,50 de sel marin, 2 grammes de gélose, 5 grammes de glycérine. Le restant de la préparation se fait comme pour la gélose ordinaire.

GÉLOSE-GÉLATINE. — En ajoutant 1, 2 p. 100 ou plus de gélose aux gélatines ordinaires, on obtient un milieu qui supporte facilement la température de l'étuve sans se liquéfier. Malheureusement, les cultures ne présentent plus du tout les caractères spéciaux qu'elles offrent sur géla-

(1) BEZANÇON et GRIFFON, Culture du Bacille tuberculeux sur le sang emprisonné dans la gélose glycérinée (*Soc. de Biol.*, 4 février 1889).

(2) DEYCKE, Weitere Erfährungen über die Bedeutung von Alkalialbuminaten (*Deutsche med. Wochenschr.*, 1894, n° 25). — ID., Die Benutzung von Alkalialbuminaten zur Herstellung von Nährboden (*Centralbl. für Bakt.*, XVII, 1895, p. 241).

tine. On n'a pas d'avantage à substituer un tel milieu à la gélose ordinaire.

Sérum solidifié. — Il suffit de porter à une température de 65° à 68° le sérum recueilli comme il a été dit page 234, pour le voir se solidifier immédiatement dans la position qui lui est donnée. Il se transforme en une masse de consistance de blanc d'œuf cuit, de coloration jaune ambré, opalescente surtout lorsqu'elle est d'une notable épaisseur.

D'après Nocard et Roux (1), l'addition de 6 à 8 p. 100 de glycérine donne un milieu bien préférable. Elle empêche la dessiccation de la surface, qui se produit toujours lorsqu'on conserve le sérum quelque temps avant de l'employer, et donne des cultures plus belles que le sérum ordinaire.

La préparation des milieux au sérum, demandant une technique spéciale, sera étudiée plus loin en parlant du mode de stérilisation qui leur est appliqué (Voy. p. 258). Les mêmes procédés sont applicables au sang défibriné.

On peut employer le sérum du sang de différentes espèces animales. Le point de solidification varie. Le sérum du mouton est celui qui se coagule le plus vite ; celui du veau est plus lent à se solidifier. Ce sont toutefois des différences minimes.

Le sérum antidiphtérique, et probablement les autres sérums similaires, paraissent très bien convenir comme milieux de cultures. On peut de cette façon utiliser commodément les sérums déjà anciens.

Gelées minérales. — On peut être conduit, pour des besoins ou des facilités spéciales, à éviter la présence de toute matière organique ou à n'introduire dans le milieu qu'une ou plusieurs matières organiques bien définies, et lorsqu'on veut user de milieux solides gélatineux, qui peuvent en particulier offrir de grands avantages pour isoler certaines espèces, à se servir de *milieux gélatineux minéraux*. Deux produits minéraux peuvent donner des gelées de bonne consistance, l'hydrate d'alumine et la silice. Winogradsky (2) conseille de choisir le dernier. Il l'emploie de la façon suivante : on prend la solution de silicate de potasse connue dans le commerce sous le nom de *verre soluble*, de consistance sirupeuse ; on l'étend de trois fois son volume d'eau. Cent centimètres cubes du mélange sont versés en agitant dans 50 centimètres cubes d'acide chlorhydrique étendu et le mélange mis dans un dialyseur. Au bout de trois jours, en laissant le dialyseur le premier jour dans l'eau courante, le reste du temps dans l'eau distillée souvent renouvelée, la solution est prête pour l'usage ; on le reconnaît à ce qu'elle ne donne aucun trouble avec le nitrate d'argent. Elle peut alors être stérilisée par ébullition et conservée dans un ballon bouché avec du coton ou du liège. Pour l'usage, on concentre une quantité suffisante de solution silicique en l'évaporant dans un petit ballon jusqu'à ce qu'elle soit réduite à la moitié de son volume. Avant que le liquide ait atteint son degré de concentration, on ralentit l'évaporation et l'on fait quelques essais successifs de son pouvoir gélatinisant. Pour cela, on prend sur un verre de montre deux ou trois gouttes du liquide et l'on y ajoute

(1) NOCARD et ROUX, Sur la culture du Bacille de la tuberculose *Ann. de l'Inst. Pasteur*, I, 1887, p. 20).

(2) WINOGRADSKY, Recherches sur les organismes de la nitrification, 4e mémoire (*Ann. de l'Inst. Pasteur*, V, 1891, p. 92).

une goutte de solution saline ; la tendance à gélatiniser doit se manifester au bout de cinq minutes ; au bout de dix à quinze minutes, la gelée doit être si ferme qu'une empreinte faite à sa surface ne s'efface plus. Il ne faut pas pousser la concentration plus loin. On distribue alors la solution silicique dans les vases à employer pour la culture et l'on ajoute la dissolution nutritive qui a été préparée d'avance, l'une des solutions minérales dont il a été parlé plus haut (p. 225 et suiv.) par exemple, ou toute autre. On prend la moitié ou le tiers de la solution silicique, suivant le degré de fermeté que l'on veut atteindre, et l'on a soin de bien opérer le mélange. Sleskin (1) propose une manière de faire peu différente.

Pommes de terre.— Les pommes de terre cuites sont d'un excellent usage. On choisit une variété blanche très grasse, les surfaces de section étant plus unies et se délitant moins. Il est à recommander plutôt de peler les pommes de terre avant de les cuire, à cause de la présence dans la pelure de certaines espèces à spores très résistantes, surtout les *Bacilles de la pomme de terre* (*Kartoffelbacillen*) ; leur stérilisation est alors bien plus facile. On les découpe par moitié ou par tranches épaisses à l'aide d'un couteau stérilisé ou en morceaux de dimensions voulues au moyen d'un tube emporte-pièce. Il est nécessaire de les laver après sous un courant d'eau, pour enlever des traces de sels de fer laissées par l'instrument qui peuvent modifier la coloration de certaines cultures, ou, mieux, d'employer un couteau à lame d'argent. En usant de l'autoclave, on les cuit et on les stérilise tout ensemble, en les laissant une vingtaine de minutes à 120°. On peut aussi préparer une *purée de pommes de terre* en les écrasant après les avoir pelées.

Le plus souvent les pommes de terre ont une réaction neutre ; quelquefois elles l'ont nettement acide ; il est bon alors, avant de les cuire, de les laisser tremper quelque temps dans de l'eau légèrement alcalinisée avec de la soude.

Pommes de terre glycérinées. — On les prépare en laissant macérer pendant quarante-huit heures les morceaux de pommes de terre pelées dans l'eau additionnée de 6 à 15 p. 100 de glycérine ; après ce temps, les morceaux sont placés dans les tubes et le tout est mis à l'autoclave à 115° pendant vingt minutes. Il est bon de mettre au fond des tubes une petite quantité de liquide glycériné. Nocard a montré que c'était un milieu de choix pour le *Bacille de la tuberculose;* le Bacille humain paraît mieux pousser avec la quantité de 6 p. 100 de glycérine.

Pommes de terre alcalines. — Lorsqu'on recherche un milieu fortement alcalin, il faut laisser tremper les morceaux pendant une nuit dans de l'eau additionnée d'environ 3 p. 100 de soude caustique et stériliser après.

Pommes de terre acides. — Les morceaux sont mis à macérer pendant une nuit dans de l'eau additionnée d'environ 3 p. 100 d'acide lactique, chlorhydrique ou autre. Un morceau, lavé au préalable, puis coupé, doit donner sur la tranche une réaction acide bien nette. A son défaut, on ajoute de l'acide à l'eau et l'on prolonge la macération ; stériliser après.

(1) Sleskin, Die Kieselsaüregallerte als Nährsubstrat (*Centralbl. für Bakt.*, X, 1891, p. 209).

Pour pouvoir aisément ajouter au milieu des liquides nutritifs divers, surtout des liquides de constitution définie, Smith (1) conseille de remplacer la pomme de terre par un empois de fécule de pomme de terre fait à l'aide du liquide choisi.

Carottes. — C'est un milieu qui convient très bien pour certaines espèces. On les prépare comme les pommes de terre.

Artichauts. — L'artichaut a été proposé par Roger (2) comme bon moyen de diagnostic.

Après avoir enlevé les feuilles, on coupe le fond en petits cubes, en ayant soin de conserver le foin. On introduit les morceaux dans des tubes dont l'extrémité fermée est remplie avec de la ouate humide. On place le foin en haut. Après avoir fermé à la ouate, on chauffe à 115° à l'autoclave pendant un quart d'heure. Quand on fait l'ensemencement, il faut avoir soin de déposer les germes au point où se fait l'insertion des fleurs, à l'union du foin et du fond.

Les cultures que l'on obtient peuvent être divisées en deux groupes : tantôt le milieu conserve sa coloration normale, avec le *Bacille typhique*, le *Staphylocoque doré* par exemple ; tantôt il prend, plus ou moins rapidement, une coloration verte qui, dans certains cas, devient extrêmement foncée, presque noire, ce qui s'observe avec le *Colibacille*, le *Bacillus subtilis*, le *Bacille du charbon*, le *Micrococcus prodigiosus*. Il est des espèces qui ne poussent pas sur ce milieu, le *Streptocoque pyogène* et le *Bacille de la diphtérie*, par exemple.

Matières amylacées cuites. — Elles peuvent toutes servir. Elles ont principalement été employées pour cultiver les espèces chromogènes. L'empois d'amidon, le riz cuit, la mie de pain, les tranches de pain et les hosties ramollies par l'eau conviennent dans bien des cas, surtout pour les espèces qui ne sont pas trop exigeantes au point de vue des aliments.

Œufs. — Les œufs peuvent être utilisés de différente façon.

Certaines espèces se cultivent bien dans l'œuf frais cru. On secoue fortement les œufs de façon à bien mélanger le blanc et le jaune, puis on les laisse macérer pendant vingt-quatre heures dans du sublimé à 1 p. 1000 pour stériliser la coquille ; on flambe la petite extrémité et l'on y fait un petit trou par lequel est fait l'ensemencement. L'orifice est ensuite fermé avec un peu de paraffine ou de cire fondue

On a surtout usé du blanc d'œuf cuit pour cultiver les Bactéries colorées dont les colonies tranchent parfaitement à la surface. On le coupe en petits morceaux qu'on met dans des tubes et stérilise à l'autoclave.

D'après Schenk (3), l'albumine des œufs de vanneau ne se coagule que vers 65°-70°, en donnant une masse hyaline, légèrement opalescente Avant coagulation, on peut, sans nuire à la dureté de la masse, ajouter un quart du volume d'eau tenant en suspension du sucre ou de la glycérine destinés à augmenter les qualités nutritives du milieu. Mais les œufs de vanneau sont rares dans bien des pays.

On peut être conduit à se servir de jaune d'œuf pour certaines

(1) Smith, Kartoffel als Kulturboden, mit einigen Bemerkungen über ein zusammengesetztes Ersatzmittel (*Centralbl. für Bakt.*, 2te Abth., V, 1899, p. 102).

(2) Roger, L'artichaut cuit comme milieu de culture en microbiologie (*Soc. de Biol.*, 16 juillet 1898).

(3) Schenk, Fester Nährboden zur Züchtung der Microorganismen (*Allgem. Wiener med. Zeitung*, XXXII, 1887, p. 214).

cultures ; le jaune d'œuf additionné de 5 p. 100 de glycérine donne un milieu de belle apparence.

Bouillie de viande. — La viande est finement hachée et cuite un certain temps, de un quart d'heure à une heure et plus, suivant la quantité, à l'autoclave à 120°. L'emploi de ce milieu peut être utile dans des cas spéciaux.

Substances inertes imbibées de liquides nutritifs. — On prend du sable, de petits blocs de plâtre ou, mieux, des morceaux de terre de pipe, qu'on place dans des vases appropriés avec une quantité suffisante du liquide que l'on désire employer. Le liquide, en excès, imprègne le substratum. La stérilisation se fait comme d'habitude.

3° Stérilisation.

La condition essentielle pour observer le développement des différentes espèces de Bactéries est d'écarter des cultures tout germe étranger à celui que l'on veut étudier. Les impuretés d'une culture peuvent provenir de trois sources différentes : du milieu où elle croît, qui n'était pas débarrassé de germes ; de l'air qui peut venir la contaminer lorsqu'on ouvre le vase pour l'observation ; et enfin de la matière qui a servi à ensemencer la culture, qui contenait des espèces autres que celle en question. On verra plus loin quelles précautions on doit prendre pour éviter l'apport de germes étrangers par l'air, apport bien moins fréquent qu'on ne peut le supposer, et quelles facilités certains procédés spéciaux, l'emploi des cultures sur plaques de gélatine surtout, offrent pour isoler avec toute certitude les espèces les unes des autres. Nous devons nous occuper ici de la première seulement des trois causes de contamination signalées et des moyens d'y obvier.

On peut, nous l'avons vu, obtenir certains milieux, des liquides normaux ou pathologiques de l'organisme principalement, absolument purs de germes, en les recueillant avec toutes les précautions nécessaires pour n'en pas introduire ; il est possible alors de les employer tels quels.

Les conditions sont d'habitude plus complexes. La masse nutritive peut renfermer plusieurs espèces de Bactéries dont le développement viendra se mêler avec celui de l'espèce étudiée ou l'empêcher complètement. C'est le cas le plus fréquent, même avec les milieux préparés à une température voisine de 100° ; on a vu que beaucoup de spores résistaient souvent pendant un temps assez long à ces hautes températures. D'un autre côté, le vase qui renferme la masse nutritive garde toujours des germes après ses parois où les ont déposés l'eau qui a servi au nettoyage ou l'air qu'y ont introduit les manipulations. Il faut à tout prix tuer ces cellules ou ces spores gênantes, il faut *stériliser* le milieu où l'on doit provoquer le développement d'une espèce donnée, et cela d'une façon certaine et absolue.

C'est Pasteur qui, dans ses recherches sur la génération spontanée (1), a, le premier, fait ressortir l'importance extrême d'une *stérilisation* absolue des milieux et appareils à employer. On doit considérer avec lui cette opération *comme la véritable base des études bactériologiques.*

(1) Pasteur, Mémoire sur les corpuscules organisés qui existent dans l'atmosphère (*Ann. de chim. et de phys.*, LXIV, 1862).

Les différents agents qui tuent les Bactéries peuvent être employés à stériliser, pourvu qu'ils n'altèrent pas le milieu soumis à leur action. Aussi est-on forcé de faire un choix ; on ne peut se servir que rarement de réactifs chimiques, et, parmi les agents physiques, celui qui a le plus d'applications est la chaleur ; l'emploi de filtres pouvant retenir les Bactéries vient immédiatement après.

1. STÉRILISATION PAR LES AGENTS CHIMIQUES

Les instruments, les vases, peuvent être désinfectés avec la solution de sublimé à 1 p. 100, l'alcool à 95° ou l'acide sulfurique. Et encore l'action de ces substances doit-elle être continuée pendant un temps assez long pour qu'elles puissent agir sur les spores à membrane résistante. C'est le seul emploi de ces *stérilisateurs chimiques* qui, dans aucun cas, ne peuvent être appliqués aux milieux eux-mêmes, à cause des modifications profondes qu'ils leur feraient subir. Aussi l'usage en est-il très limité et les met-on complètement de côté, et avec raison, lorsqu'il est possible de faire agir une cause plus sûre et plus facile à manier, la chaleur.

2. STÉRILISATION PAR LA CHALEUR

On peut employer soit la chaleur sèche, soit la chaleur humide.

1° *Stérilisation par la chaleur sèche.*

Le procédé le plus simple est le flambage, qui s'obtient en passant, pendant un temps suffisant, dans la flamme du gaz ou de l'alcool, les objets que l'on veut stériliser. On s'en sert couramment pour les fils de platine, les menus objets en verre, en porcelaine, même pour les instruments d'acier ; ces derniers, il faut le dire, ne se trouvent pas trop bien du traitement. Les appareils les plus commodes pour ce mode de stérilisation sont le *four de Pasteur* et le *stérilisateur à air chaud* décrits précédemment (p. 198). A cause de la résistance de certains germes aux températures élevées, il faut user de hautes températures, 150° au moins, 180° au mieux.

On ne peut naturellement soumettre à ce procédé de stérilisation que les objets qui ne sont pas altérés par de telles températures : la verrerie, les instruments peu délicats par exemple ; il ne peut pas être question de l'employer pour les milieux de culture, pour lesquels on doit user de la chaleur humide. Pour éviter les bris trop fréquents, la verrerie doit être refroidie lentement et jamais brusquement.

2° *Stérilisation par la chaleur humide.*

Cette stérilisation peut s'opérer à une température inférieure à 100° ou à une température supérieure à 100°.

L'*ébullition simple* peut suffire ; c'est en tout cas un moyen très commode, n'exigeant qu'un bec de gaz ou une forte lampe à alcool. On n'en doit jamais faire usage cependant que pour des milieux de petit volume, des tubes à essai ou des petits ballons, par exemple. On les promène dans la flamme de manière à soumettre à la température de 100° successive-

ment les différentes couches du liquide et même le vase lui-même, y compris la bourre de coton ou le bouchon qui le ferme. C'est un procédé dont il ne faut se servir, disons-le, qu'à défaut d'autres, quand on ne dispose que d'une installation tout à fait provisoire. Nombreuses, en effet, sont les Bactéries dont les spores supportent, sans perdre la faculté de germer, des températures supérieures à 100° pendant un temps assez long. Il faut cependant reconnaître que la simple ébullition dans l'eau est un procédé très applicable pour la stérilisation des instruments que l'on destine aux expérimentations. Pour éviter toute détérioration, il est à recommander, pour les instruments d'acier, d'ajouter à l'eau une petite quantité de borax. Les instruments ordinaires de petit volume peuvent être stérilisés après un quart d'heure d'ébullition.

Le *chauffage au bain-marie* ordinaire, quoique ne donnant pas une température supérieure, est de beaucoup préférable, parce qu'on peut maintenir la chaleur le temps nécessaire pour vaincre la résistance de la plupart des germes. Tout ustensile de forme et de dimensions convenables, où l'on peut faire bouillir de l'eau, peut servir de bain-marie. On doit s'appliquer à y maintenir les appareils que l'on va soumettre à l'action de l'eau bouillante, de façon qu'ils ne puissent pas être dérangés par l'ébullition et que leurs orifices, bouchés avec des tampons de coton, soient préservés des projections du liquide, tout en ayant soin de les faire plonger le plus possible dans le bain pour qu'ils soient soumis à son action sur la plus grande surface possible. Ceci s'obtient en usant de petits paniers en toile métallique, de supports à pinces, de tout autre moyen qu'on pourra imaginer et en réglant la chauffe pour éviter une ébullition tumultueuse.

Le procédé courant de stérilisation appliqué dans les laboratoires est la *stérilisation à la vapeur d'eau*, cette vapeur pouvant être utilisée à la pression normale, elle est alors à la température fixe de 100°, ou sous pression, à une température d'autant plus élevée que la pression est plus forte.

Le chauffage à 100° s'opère avec toute facilité dans le *stérilisateur à vapeur* dont le mécanisme et le mode de fonctionnement ont été décrits précédemment (p. 199). Le temps que les objets à stériliser doivent y séjourner varie suivant leur volume. Les pommes de terre doivent y rester une heure, les tubes à gélatine et à gélose, les ballons de faible capacité, de une heure et demie à deux heures. Le temps utile pour la stérilisation ne doit être compté qu'à partir du moment où la vapeur se dégage régulièrement par l'interstice annulaire du couvercle.

L'application de températures plus élevées, 100°-120° et plus, s'obtient à l'aide de l'*autoclave de Chamberland* (Voy. p. 201). Avec cet appareil, on arrive très facilement à maintenir pendant deux heures et plus des températures de 115°-120°, tout à fait suffisantes pour détruire d'une façon absolue la vitalité des spores les plus résistantes. Les bouillons supportent d'ordinaire très bien ces hautes températures ; elles semblent même plutôt favorables à leur bonne qualité, en favorisant la production de peptones aux dépens des albuminoïdes. Il n'en est malheureusement pas de même de certaines gelées nutritives. La gélatine de qualité inférieure s'altère très vite. Déjà, lorsqu'on la chauffe longtemps à 100°, elle peut perdre la propriété de se prendre en gelée par refroidissement. A une température supérieure, les modifications peuvent être plus profondes. Au-dessus de 106°, elle dégage de l'ammoniaque, puis il se forme à ses

dépens des produits très solubles et même déliquescents ; elle devient un véritable bouillon. La gélatine extrafine supporte très bien 120° ; il ne faut cependant pas l'exposer trop souvent à cette température. La gélose supporte plus facilement la chaleur ; maintenue cependant trop longtemps aux environs de 120°, elle brunit et se transforme en un liquide visqueux renfermant des produits ulmiques.

De ces données, il résulte que l'emploi des hautes températures, 110°-120°, donne d'excellents résultats et est à ériger en méthode générale de stérilisation ; les autres procédés doivent être réservés pour les cas où il n'est pas possible de se servir de l'autoclave. La simple stérilisation à la vapeur, à 100°, peut du reste être répétée plusieurs fois pour augmenter les chances de l'opération.

On peut aussi obtenir des températures élevées à l'aide de bains d'huile ou du bain-marie à chlorure de calcium décrit page 207. L'emploi de ce procédé complique trop le manuel opératoire pour qu'il soit à recommander. Il n'est du reste praticable que pour les milieux pouvant être enfermés dans des ballons scellés, maintenus immergés dans le liquide.

3° *Stérilisation par chauffages répétés.*

La facilité avec laquelle est stérilisé un milieu de culture donné est en rapport inverse de sa puissance nutritive. Un liquide peu nutritif, les liqueurs minérales de Pasteur ou de Cohn, porté à des températures de 70° à 80°, peut rester indéfiniment limpide. D'après Pasteur, une ébullition de deux ou trois minutes suffit pour préserver l'*eau de levure* de toute altération. Pour Miquel (1), il n'y a là qu'une *stérilisation apparente*, due à ce que le milieu n'exerce pas, sur les quelques germes qu'il peut encore contenir, une excitation suffisante pour les faire sortir de leur état de vie latente. La preuve en est que, si l'on vient à ajouter, avec toutes précautions nécessaires pour n'en pas introduire d'autres naturellement, quelques centimètres cubes de bon bouillon, on voit souvent le mélange des deux liqueurs se troubler et montrer des quantités de Bactéries, alors que séparément elles seraient restées absolument stériles.

Dans bien des cas, cependant, une température de 100° est nuisible. Le sucre, plusieurs composés ammoniacaux, peuvent se décomposer ; l'urée s'hydrate, les albuminoïdes se coagulent ; la gélatine peut se peptoniser et perdre la propriété de se prendre en gelée, si elle est maintenue trop longtemps à un tel degré de chaleur. Ces altérations portent surtout sur les liquides de l'organisme, sérum sanguin et autres, lait ; aussi faut-il fréquemment user, lorsqu'on les emploie, d'un procédé spécial, la stérilisation par *chauffages répétés*.

Les spores seules, on le sait, supportent une température élevée ; les cellules végétatives meurent bien avant elles : une chaleur de 60° à 65° peut être considérée comme mortelle pour elles ; c'est sur ce fait qu'est basée la pasteurisation pouvant n'arrêter que pendant quelque temps le développement de microbes contenus dans des liquides que de plus hautes températures pouvaient altérer. Il est vrai qu'on a décrit des

(1) Miquel, Les organismes vivants de l'atmosphère. Paris, 1882, p. 146.

Bactéries se développant fort bien à une température de 74° (1), mais c'est une véritable exception et, de plus, de telles espèces paraissent être rares. Aussi doit-on espérer pouvoir tuer toutes les cellules végétatives que contient un liquide en le soumettant, pendant une demi-heure ou une heure, à une température de 65°. Restent les spores. L'expérience démontre qu'il est possible d'arriver à les tuer, par une série de chauffages successifs à ces mêmes températures, séparés par des intervalles de quelques heures à un jour. Tyndall (2) donnait de ce fait l'explication suivante : placées à une température favorable, 30° à 34°, les spores existantes se mettent facilement à germer ; au bout d'un jour ou deux, la plupart ont rajeuni. Une seconde chauffe à 65° tue d'autant plus facilement les cellules produites qu'elles sont jeunes et, par conséquent, plus sensibles. On opère de même une troisième fois et une quatrième si on le croit nécessaire ; trois opérations suffisent d'ordinaire. Il est beaucoup plus rationnel d'admettre, avec Duclaux (3), que ces températures employées, bien que ne pouvant tuer les spores, ont une certaine prise sur elles et diminuent d'abord leur résistance, puis finissent par la vaincre complètement.

On peut appliquer ces chauffes successives aux appareils que l'on est obligé de stériliser par ébullition simple ou au bain-marie ; on arrive ainsi, en particulier pour ce dernier mode opératoire, lorsqu'on a acquis une certaine habitude dans la manipulation, à une stérilisation certaine à l'aide de températures de 100° ou au-dessous.

Il existe du reste un excellent critérium de cette opération, dont on ne doit jamais négliger l'emploi. Les conserves mal stérilisées se troublent au bout de trois ou quatre jours à 30° ou 35°. On doit alors se faire une règle de n'employer que des milieux de culture vérifiés à ce point de vue ; la provision faite à l'avance sera mise cinq ou six jours à l'étuve et soigneusement vérifiée ce temps écoulé.

Miquel (4), qui se prononce contre ce procédé, cite à l'appui de son dire des espèces dont les spores demandent un ou plusieurs mois pour sortir de leur vie latente. C'est, il faut l'avouer, une exception et une rareté. D'ailleurs, la pratique journalière prouve surabondamment la valeur relative de ce procédé ; toutefois, il est bon de ne l'employer qu'en dernier lieu, lorsqu'il n'est pas possible d'atteindre le résultat cherché à l'aide de méthodes plus sûres et à l'abri de toute critique.

Le mode opératoire est de Tyndall, mais c'est Koch (5) qui a érigé la *stérilisation par chauffages répétés* ou encore *tyndallisation* en véritable méthode, en l'appliquant à la préparation de milieux nutritifs au sérum sanguin qui sont parfois d'une si grande utilité.

Le sérum du sang des différents mammifères, séparé du caillot après la rétraction, peut, sans être modifié dans sa composition ni dans son aspect, supporter pendant longtemps une température de 60° environ.

(1) Van Tieghem, Sur les Bactériacées vivant à la température de 74° (*Bull. de la Soc. Bot.*, 1881, p. 35). — Miquel, Monographie d'un Bacille vivant au delà de 70° C. (*Ann. de micr.*, 1888).

(2) Tyndall, Les microbes, traduction française, 1881.

(3) Duclaux, Traité de microbiologie.

(4) Miquel, Les organismes vivants de l'atmosphère, et *Annuaire de l'Observat. de Montsouris*, 1880-1887, n° 15.

(5) Koch, *Berlin. klin. Wochenschr.*, 1882, n° 15.

Cette température suffit généralement à tuer les Bactéries qui sont venues contaminer le liquide pendant les manipulations. En répétant la chauffe de 58° à 60° de quatre à six fois avec un intervalle d'un ou deux jours entre chaque opération, on arrive à obtenir un milieu qui, conservé en étuve une semaine ou au delà, se maintient parfaitement intact ; il était donc tout à fait dépourvu de germes.

L'emploi du sérum liquide est assez limité ; c'est surtout comme milieu de culture solide qu'il rend des services. Porté à la température de 70°, le liquide se prend en une gelée ferme, de teinte ambrée, légèrement opalescente. L'abaissement de température ne produit plus de liquéfaction : le sérum s'est figé dans la situation qu'il occupait. Voici, dans tous ses détails, la technique indiquée par Koch, et suivie dans les laboratoires où l'on ne recueille pas le sérum pur comme nous l'avons indiqué précédemment (p. 234).

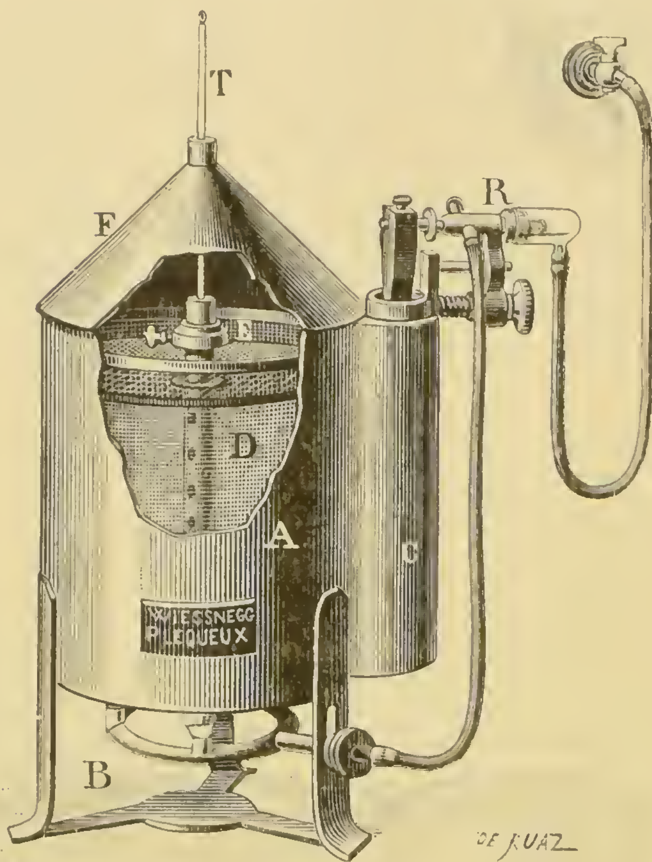


Fig. 93. — Bain-marie muni du régulateur métallique de d'Arsonval.

Nous prenons le cas le plus compliqué, celui où l'on doit employer du sérum recueilli à l'abattoir sans précautions particulières et qui a forcément reçu des Bactéries de l'air ou des vases dans lesquels il a été recueilli. Le sang recueilli dans des vases, qu'il est bon de stériliser à l'avance, est mis vingt-quatre à trente-six heures dans un endroit frais. La coagulation se fait et le caillot se sépare du sérum, clair, de coloration jaunâtre. On décante le sérum et on le répartit dans les appareils de culture. Ce sont d'ordinaire des tubes à essai, stérilisés d'avance au stérilisateur à air chaud, dont on remplit le quart ou le tiers inférieur et qu'on bouche soigneusement avec un tampon d'ouate.

On stérilise ces tubes au moyen de chauffages répétés à 58°-60° que l'on opère dans des appareils à température réglée. La figure 93 représente un bain-marie spécial, muni du régulateur métallique, pour la stérilisation du sérum. On remplit d'eau l'espace annulaire et la partie inférieure de la cavité centrale et l'on y place le panier en toile métallique représenté en place, garni des tubes à essai contenant le sérum. L'eau du bain-marie, naturellement, ne doit jamais atteindre les tampons d'ouate ; il est même bon de n'en verser qu'à une distance raisonnable des bouchons. On allume les brûleurs et l'on observe le thermomètre placé dans la tubulure du couvercle de l'appareil. L'eau contenue dans l'espace annulaire agit sur le régulateur métallique qui est établi

comme celui qui a été décrit page 214. Le réglage se fait comme il a été dit pour l'étuve, à une température de 58°-59°. Une fois ce réglage établi, le bain-marie est réglé pour cette température, à laquelle il reviendra de lui-même lorsqu'on le rallumera, après refroidissement. Le chauffage dure une demi-heure ; il est répété, nous l'avons dit déjà, de quatre à six fois à un jour d'intervalle. L'opération demande une semaine.

On solidifie le sérum en inclinant les tubes de façon à pouvoir utiliser une plus grande surface possible du milieu. Les *coagulateurs de sérum* des figures 95 et 96 répondent mieux au but proposé. L'inclinaison des tubes est obtenue en élevant ou abaissant plus ou moins le support central; le réglage se fait aussi par le régulateur de d'Arsonval. On chauffe doucement l'étuve jusqu'à atteindre une température de 60° ; on laisse monter avec plus de précaution encore à 65°. La coagulation s'opère quelquefois à cette température ; le plus souvent, il faut arriver à 68° et même pousser à 70°. Le sérum additionné de 6 p. 100 de glycérine ne se solidifie guère que vers 75° ; il faut en être prévenu. On a intérêt à ce que la coagulation se fasse à la plus basse température possible, le milieu en est d'autant plus transparent ; le sérum qui ne se prend qu'au-dessus de 70° est d'ordinaire très opaque. La température à laquelle le liquide s'est solidifié est maintenue une bonne heure ; c'est à ce moment que l'on doit faire intervenir l'action du régulateur que l'on provoque en mettant en place le tube vertical dès que le changement d'état s'est opéré. La présence de beaucoup de vapeur d'eau dans l'étuve paraît favoriser la transparence du produit obtenu.

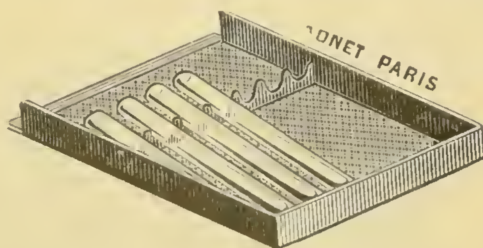


Fig. 94.

La solidification du sérum peut se faire dans d'autres vases que les tubes. Les godets, les cristallisoirs que l'on recouvre d'un disque de verre, les petits ballons, sont d'un très bon usage dans les cas spéciaux. Le petit support représenté figure 94 peut alors rendre de grands services ; il suffit de le placer, garni de tubes et recouvert d'une plaque de verre, au-dessus d'un bain-marie ou de tout autre vase où de l'eau est maintenue au-dessous de 100°.

Il est très possible d'ajouter au sérum des substances nutritives, une solution concentrée de peptones, de glucose, par exemple ; on exalte par là les qualités du milieu. Il faut neutraliser avec soin les liquides que l'on veut additionner en n'usant que de la plus petite quantité d'eau possible, et les mélanger au sérum fluide avant la stérilisation. Cette addition élève toujours un peu le point de coagulation.

La teinte et la consistance de la gelée obtenue varient toujours quelque peu, suivant l'espèce animale qui a fourni le sang et suivant la façon dont s'est opérée la coagulation et la rétraction du caillot. L'addition de peptones, qui est à recommander (de 1/2 à 1 p. 100), fonce en général la couleur.

Pendant la solidification, il se dégage toujours de la vapeur d'eau qui se condense et vient former un petit amas de liquide à la partie déclive du tube. Cette présence d'eau est favorable : elle empêche la dessicca-

tion trop rapide de la surface et, lorsque la colonie arrive à son contact, elle peut s'y propager et offrir quelques particularités intéressantes de sa culture dans les milieux liquides. Le sérum additionné de 3 à 6 p. 100 de glycérine se dessèche moins et est un précieux milieu pour certaines espèces, le *Bacille de la tuberculose* par exemple.

Il est évident que lorsqu'on peut recueillir du sérum absolument pur de germes, d'après la méthode de Pasteur, comme cela a été indiqué page 234, les manipulations se trouvent de beaucoup simplifiées. La stérilisation est d'emblée supprimée. On transporte le sérum à l'aide de pipettes stérilisées et on le distribue dans les tubes à essai qui ont été au préalable portés à 140°, pendant un quart d'heure, dans l'étuve sèche. La solidification se fait de suite comme ci-dessus.

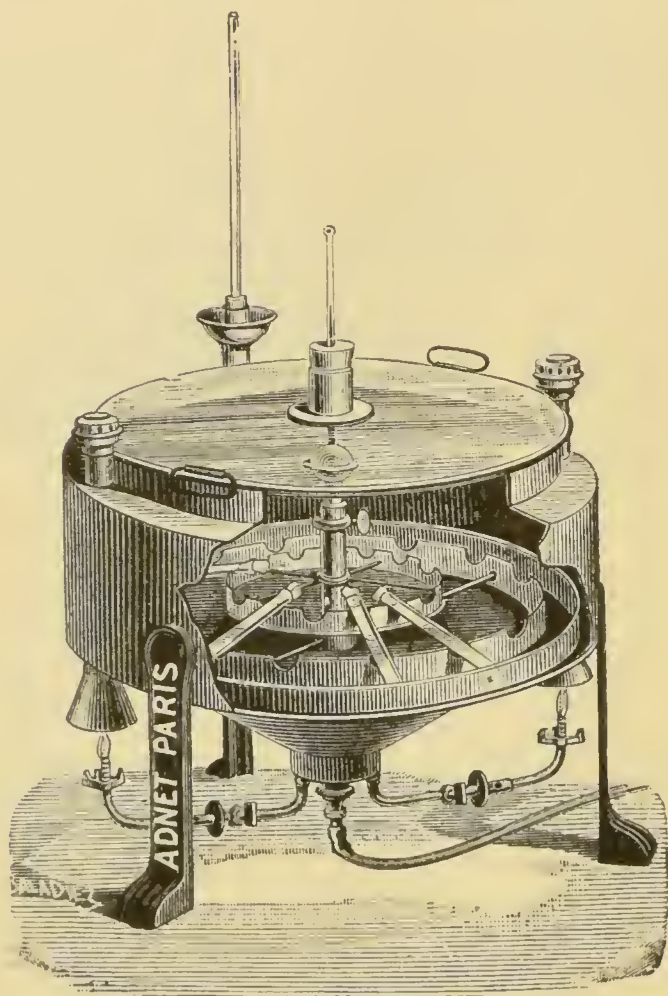


Fig. 95. — Étuve pour coaguler le sérum.

La préparation du sérum humain (Voy. page 238) ne diffère en rien de celle qui vient d'être donnée. Comme, d'habitude, on ne dispose que de très faibles quantités de cette sérosité, il est bon, par économie, de n'en solidifier qu'une mince couche de quelques millimètres sur une masse fondamentale de gélose qui sert simplement de support.

Il est à recommander pour le sérum préparé de cette manière, plus encore que pour les autres milieux que l'on a pu soumettre à des procédés de stérilisation plus rigoureux, de laisser les tubes une semaine au moins à l'étuve ou à une température moyenne avant de les employer, afin de pouvoir écarter ceux qui présenteraient la moindre trace de développement.

Unna (1) a modifié la préparation des milieux au sérum solide, de façon à pouvoir les soumettre sans modifications défavorables à une température élevée. Il opère comme il suit. A une petite quantité de sérum de sang de veau, on ajoute goutte à goutte, en agitant, de l'eau oxygénée jusqu'à ce que le liquide, de teinte jaunâtre au début, devienne incolore. La quantité d'eau oxygénée à ajouter est à peu près égale à la moitié du sérum employé. Lorsque la réaction est acide, ce qui arrive souvent avec l'eau oxygénée du commerce, il faut neutraliser au carbonate de soude jusqu'à légère réaction alcaline. Le sérum ainsi modifié se laisse facilement filtrer. De plus, il ne se coagule qu'à une température bien plus élevée, de 90° à 120°. Le mieux, pour y arriver, est de le

(1) Unna, Ueber eine neue Art estarrten Blutserum und über Blutserumplatten (*Monatshefte für prakt. Dermat.*, V, 1886, n° 9).

chauffer dans une petite étuve à huile. Quand la solidification est complète, on maintient la température pendant une heure environ pour obtenir un coagulum bien ferme; il se dégage une assez grande quantité d'eau de condensation, qui se réunit dans les parties froides du tube. On rejette cette eau et l'on remet les tubes dans le stérilisateur à vapeur où ils doivent rester une demi-heure.

Ces procédés de stérilisation du sérum ont eu une très grande importance tant que ce milieu était le seul qui permettait d'obtenir le développement de certaines espèces de Bactéries, le Bacille de la tuberculose, le Gonocoque, entre autres. Ils en ont une bien moindre aujourd'hui

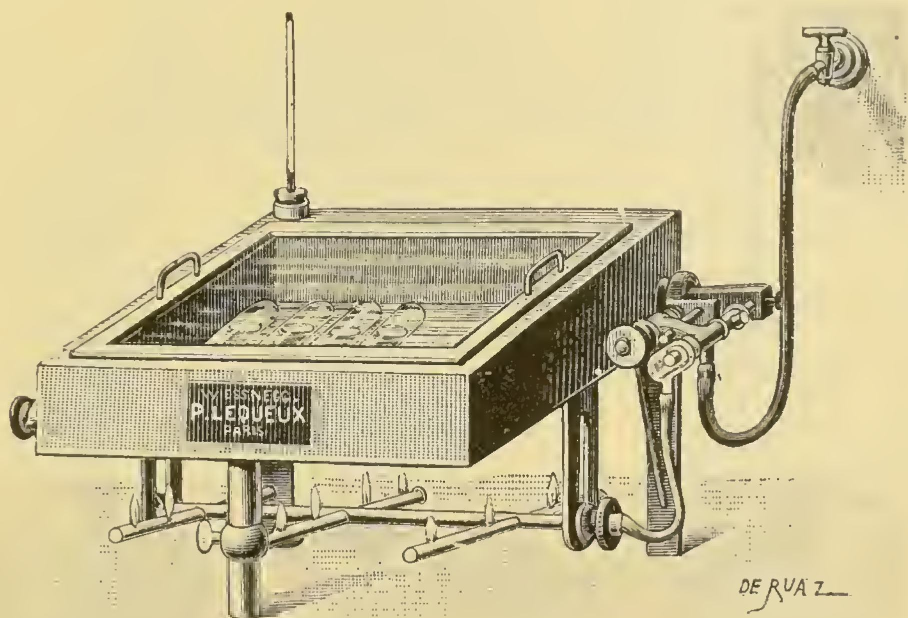


Fig. 96. — Appareil pour coaguler le sérum.

que l'on a obtenu d'autres milieux de culture plus faciles à préparer et permettant une végétation plus abondante même de ces microbes. Malgré tout, nous verrons, chemin faisant, que c'est encore un milieu très employé.

3. STÉRILISATION PAR FILTRATION

Le degré de chaleur, qui est nécessaire pour tuer les germes d'une manière sûre, altère bien des milieux nutritifs, les liquides organiques surtout, dans leur composition ou dans la forme sous laquelle on veut les utiliser. Pour les obtenir purs de tous germes, sans les modifier, Pasteur (1) a imaginé de les filtrer à travers des corps poreux, à orifices extrêmement fins; c'est le procédé de *stérilisation par filtration à froid*. Les papiers à filtrer les plus épais laissent très facilement passer les Bactéries de petite taille et surtout les spores, même en superposant plusieurs doubles l'un sur l'autre; on n'a pu songer à s'y adresser. Pasteur s'est servi, au début, de tampons de plâtre; la filtration était hâtée en faisant le vide dans le récipient inférieur, où s'écoulait le liquide pur. Miquel et Benoist (2) ont employé des dispositifs semblables où la plaque filtrante était faite d'amiante et de plâtre mêlés; ils obtenaient une fil-

(1) Pasteur et Joubert, *C. R. de l'Acad. des sc.*, LXXXV, 1877, p. 161.
(2) Miquel, Les organismes vivants de l'atmosphère, p. 101.

tration assez rapide en faisant le vide dans le vase où était recueilli le liquide filtré, ou en faisant agir une forte pression dans le récipient supérieur où se trouvait le liquide impur. Les liquides qui ont filtré à travers le plâtre sont plus ou moins chargés de sulfate de chaux et, de plus, la plaque filtrante demande à être renouvelée à chaque opération. Aussi préfère-t-on user de filtres fabriqués avec de l'argile cuite, de la terre de pipe, du biscuit. Les bougies de porcelaine dégourdie à 1200°, imaginées

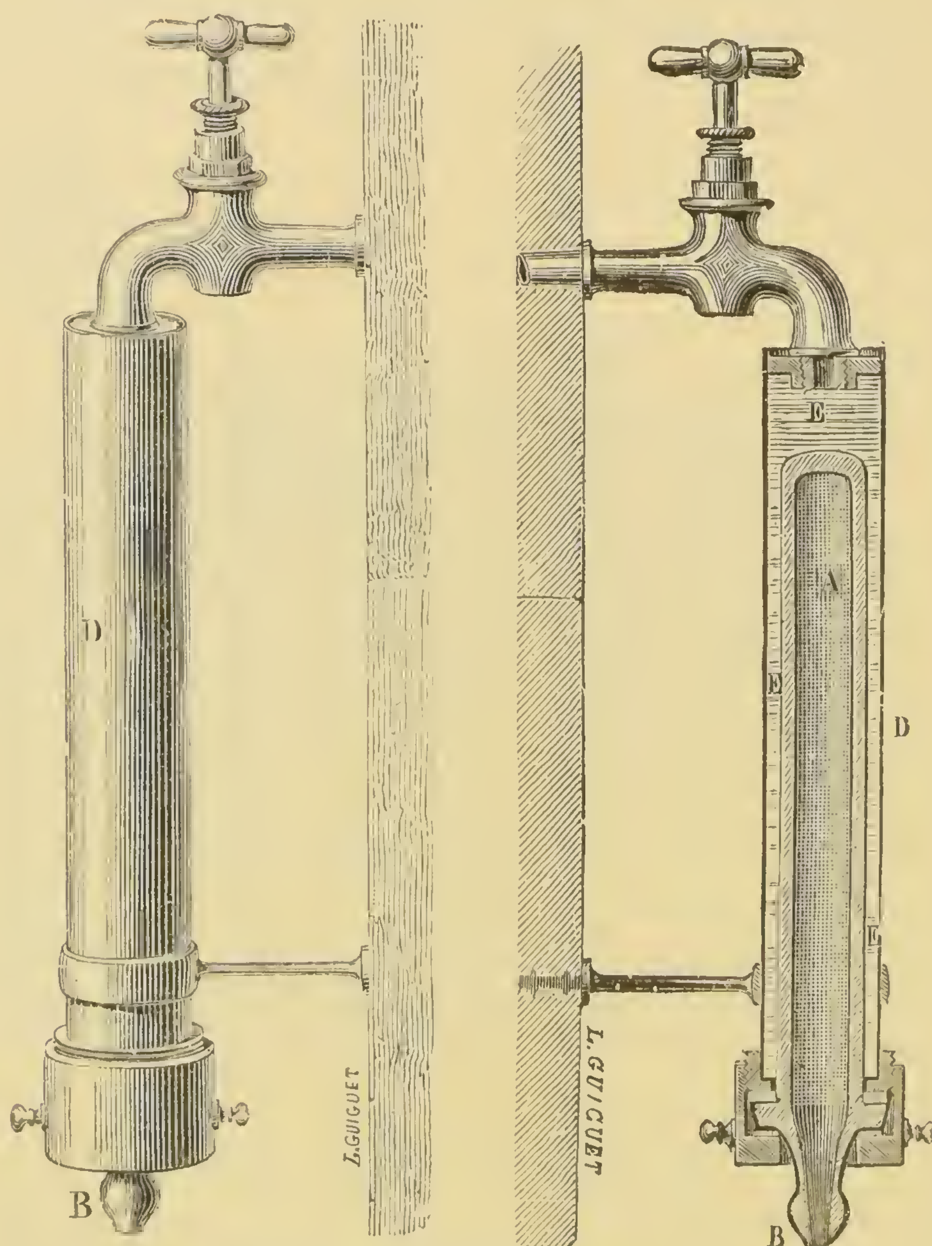


Fig. 97. — Filtre Chamberland.

par Chamberland (1), constituent des appareils filtrateurs parfaits. Les bougies de porcelaine d'amiante de Garros donnent encore de meilleurs résultats au point de vue des liquides filtrés. Tout le monde connaît l'appareil représenté par la figure 97, très employé, sous le nom de *filtre Chamberland*, pour la purification des eaux potables et qui peut être appliqué à la filtration des milieux à employer pour les cultures, en modifiant légèrement son dispositif. Il consiste essentiellement en une bougie A, de porcelaine dégourdie, fermée à un bout et terminée à l'autre par un téton ouvert. Il existe deux types de bougies Chamberland, le type B, plus serré, plus dur, et le type F, plus perméable. Cette

(1) Chamberland, *Soc. de Biol.*, 1882.

bougie est fortement maintenue dans une enveloppe cylindrique D, par une armature vissée G, de telle sorte que son extrémité ouverte B sorte seule à la partie inférieure. Toute communication de la cavité de l'enveloppe avec l'extérieur est empêchée par un anneau de caoutchouc que la pièce C comprime fortement. La majeure partie de la bougie se trouve

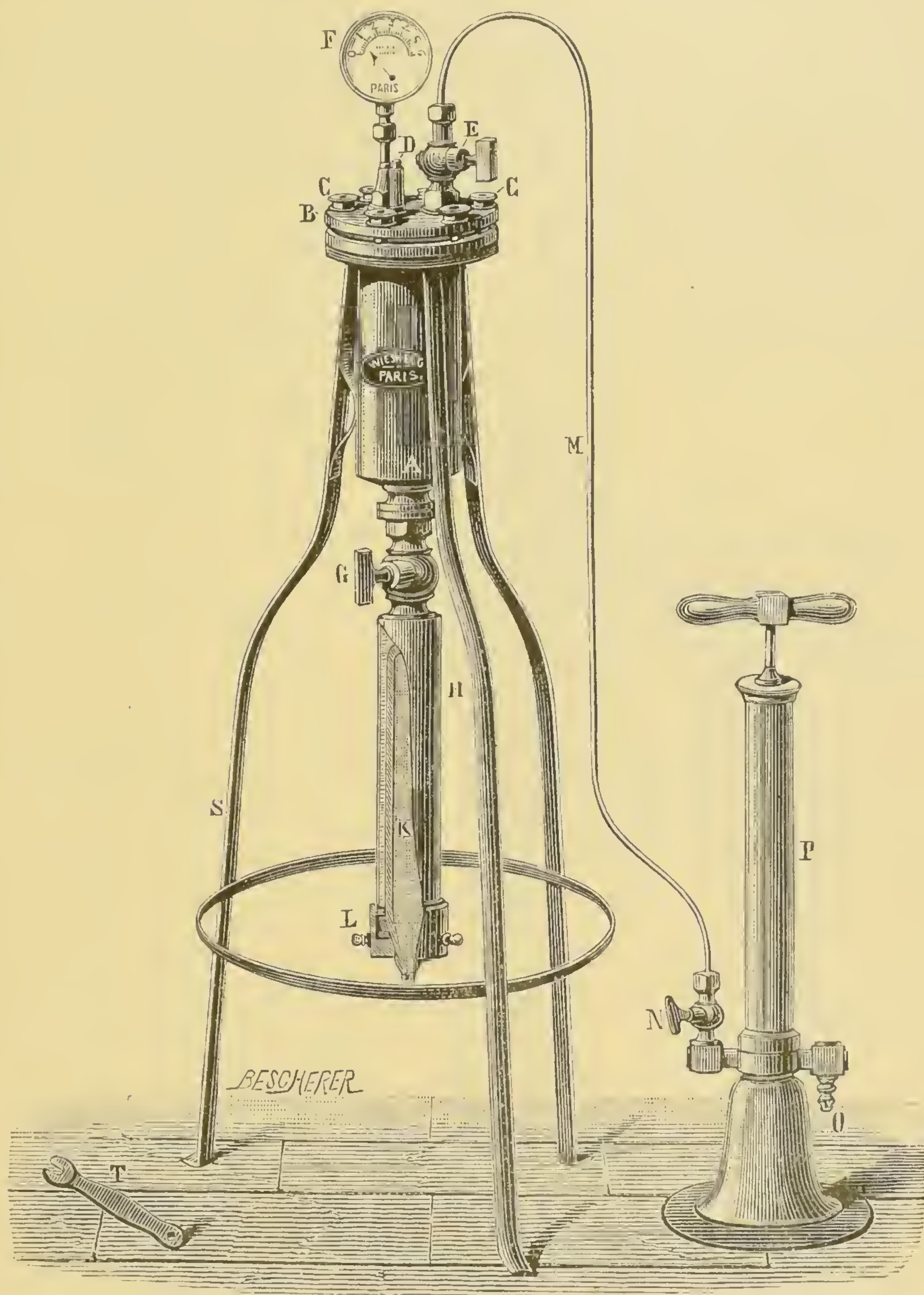


Fig. 98. — Filtre à pression graduée.

donc libre dans la cavité E de l'enveloppe où arrive, sous pression, le liquide à filtrer. Pour l'eau, il suffit de visser la pièce métallique à un robinet branché sur la canalisation. Le liquide est obtenu très pur, si l'on a eu soin de stériliser la bougie à une haute température, à l'autoclave à 120° par exemple, avant l'opération, et de le recueillir dans des vases exempts de germes. Lorsque le filtre a fonctionné quelque temps et que les pores de la bougie peuvent être obstrués en partie par les

sédiments déposés à la surface, on la brosse fortement à grande eau et on la fait bouillir longtemps dans de l'eau acidulée ou additionnée de carbonate de soude pour détruire toute la matière organique qui peut l'imprégner. On peut aussi les stériliser en les faisant rougir à feu nu, sur un fourneau à gaz, par exemple, après complet nettoyage et séchage parfait pour éviter la casse.

Avant de se servir d'une bougie, il est bon de s'assurer qu'elle ne présente pas de fissure, qui viendrait fausser les résultats. On la vérifie en la branchant sur une petite pompe, comme celle de l'appareil figure 102, ou sur une forte poire en caoutchouc. On plonge totalement la bougie dans l'eau et l'on y comprime de l'air. S'il existe une fissure, on voit des bulles d'air sortir en chapelet.

Lorsqu'on utilise une forte pression, il est bon d'employer la bougie B, plus résistante.

Le *filtre de Garros* (1), à bougie de porcelaine d'amiante (fig. 99), a une disposition un peu différente, dont il est facile de se rendre compte d'après le dessin donné. Il s'utilise comme le filtre Chamberland.

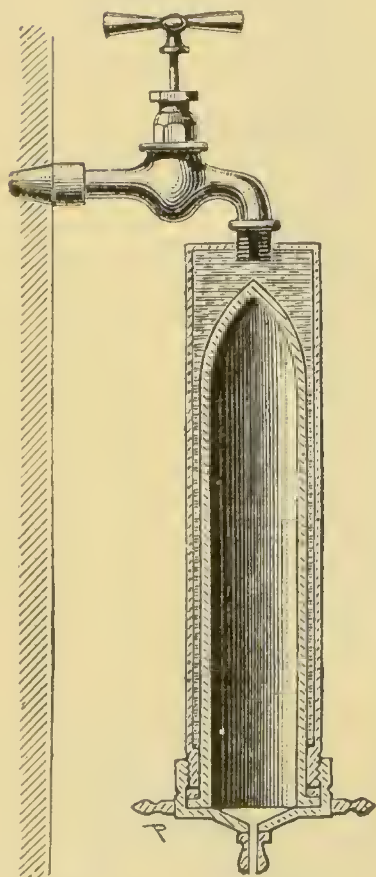


Fig. 99. — Filtre de Garros (Adnet).

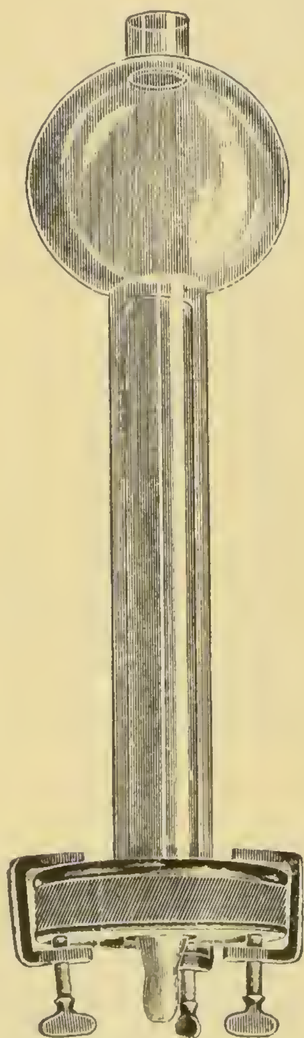


Fig. 100. — Appareil à filtration de Novy (Lautenschläger).

La disposition représentée figure 100, et imaginée par Novy, permet de mieux suivre la marche de l'opération. Le réservoir est en verre, d'un seul morceau. L'adaptation parfaite de la bougie se fait à l'aide d'un disque de caoutchouc et d'une armature métallique à vis. La bougie employée est la *bougie Berkefeld* en terre d'infusoires, plus poreuse que la bougie Chamberland, par conséquent filtrant plus vite, mais plus fragile et d'un prix plus élevé.

Les *bougies Berkefeld* se font aussi en plusieurs numéros, de plus en plus poreux. Elles laissent plus facilement passer que la bougie Chamberland, surtout B, les microbes très ténus de la catégorie des microbes dits *invisibles* ou encore *microbes filtrants*.

Les liquides ne filtrent que très lentement dans ces appareils quand l'opération n'est pas aidée par une pression convenable. Les solutions visqueuses, en particulier, ne passent pas du tout. Aussi est-il nécessaire

(1) Garros, Sur une nouvelle porcelaine : porcelaine d'amiante (*C. R. de l'Acad. des sc.*, 1891, p. 864).

de pouvoir faire agir sur le liquide à filtrer une pression que l'on peut graduer à volonté. L'appareil représenté figure 98 est très propre à tous ces usages. Le liquide qui doit être filtré est placé dans le récipient A, en cuivre, à parois solides, dont le couvercle B se fixe avec de fortes vis de pression C. Ce réservoir porte à sa partie inférieure un filtre en tout semblable au filtre Chamberland, dont nous venons de donner la description, muni d'une bougie type B. Un robinet G règle le passage du liquide du réservoir dans l'espace qui entoure la bougie K. La pression s'obtient à l'aide d'une pompe aspirante et foulante de Gay-Lussac B, qui se relie à une tubulure à robinet E que porte le couvercle du réservoir. Un manomètre F indique la pression obtenue. La bougie doit être soigneusement stérilisée à chaud et fermée, encore chaude, par un tampon d'ouate, pour empêcher l'entrée d'air contaminé lors du refroidissement. On peut la terminer par un trocart aigu que l'on fait pénétrer chaud à travers le tampon d'ouate qui bouche le ballon stérilisé où doit être recueilli le liquide. Le dispositif de flacon représenté figure 107

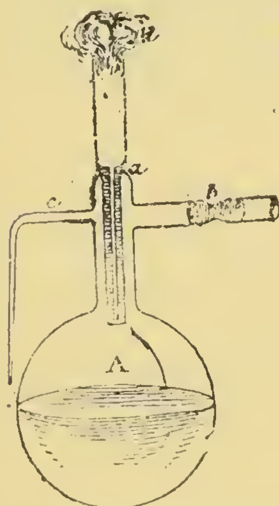


Fig. 101. — Appareil de Duclaux pour la stérilisation du lait.

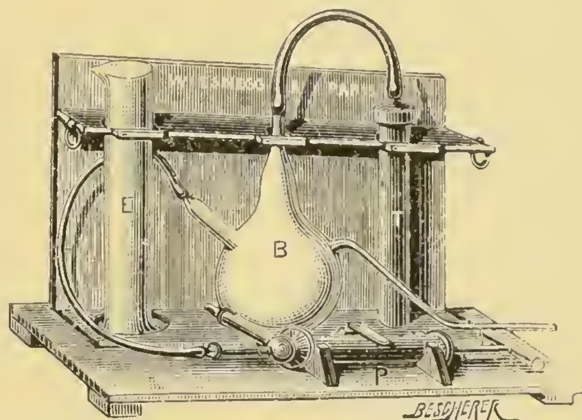


Fig. 102. — Appareil de Chamberland pour la stérilisation par filtration.

présente de grandes commodités; en adaptant un robinet au tube de vidange, on peut opérer rapidement sur de grandes quantités de liquide. L'appareil est coûteux, mais il convient parfaitement pour stériliser facilement bien des liquides nutritifs. La bougie se nettoie comme précédemment ou en la passant au feu après l'avoir bien lavée. Il est plutôt à recommander de prendre une bougie neuve à chaque opération de quelque importance.

Duclaux a employé, dans ses études sur le lait (1), un appareil très simple et peu coûteux, pouvant rendre de grands services pour la stérilisation à froid (fig. 101). C'est un ballon A, dont le col a été étiré en *a* et auquel on a soudé deux tubulures latérales *c* et *b*. La tubulure *c* est étirée en pointe et fermée; la seconde, *b*, est laissée ouverte, et fermée seulement par un tampon de coton. En *a*, on ajuste un tube en terre de pipe, poreuse, fermé par l'extrémité inférieure, qui plonge dans le liquide et est fixé en *a* par du mastic de façon à laisser libre son orifice. L'appareil, stérilisé dans l'étuve sèche, est réuni en *b* à une trompe et en *d*, par

(1) Duclaux, Le lait, études chimiques et microbiologiques. Paris, J.-B. Baillière, 1887, p. 92.

sa partie supérieure débouchée, à un réservoir contenant le liquide à

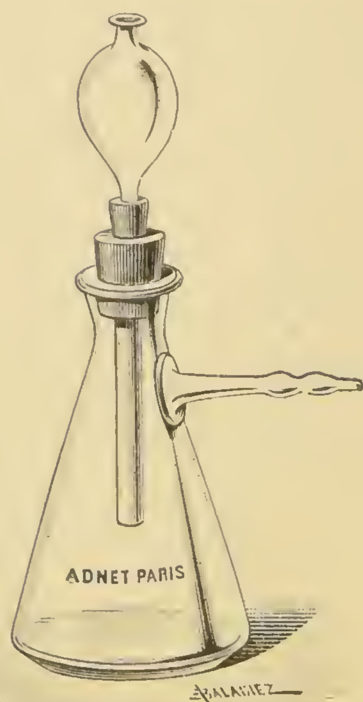


Fig. 103. — Filtre de Kitasato.

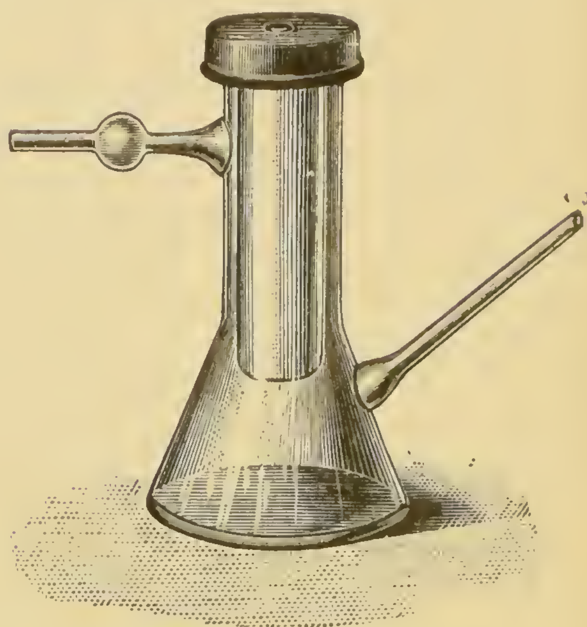


Fig. 104. — Filtre de Reichel

stériliser. Sous l'influence du vide fait en A, le liquide filtre rapidement à travers le tube de terre poreuse.

Le petit appareil représenté figure 102, imaginé par Chamberland, est des plus commode. Il se compose d'une pompe P, d'une éprouvette E, où se place le liquide à filtrer, d'une bougie ordinaire T et d'un

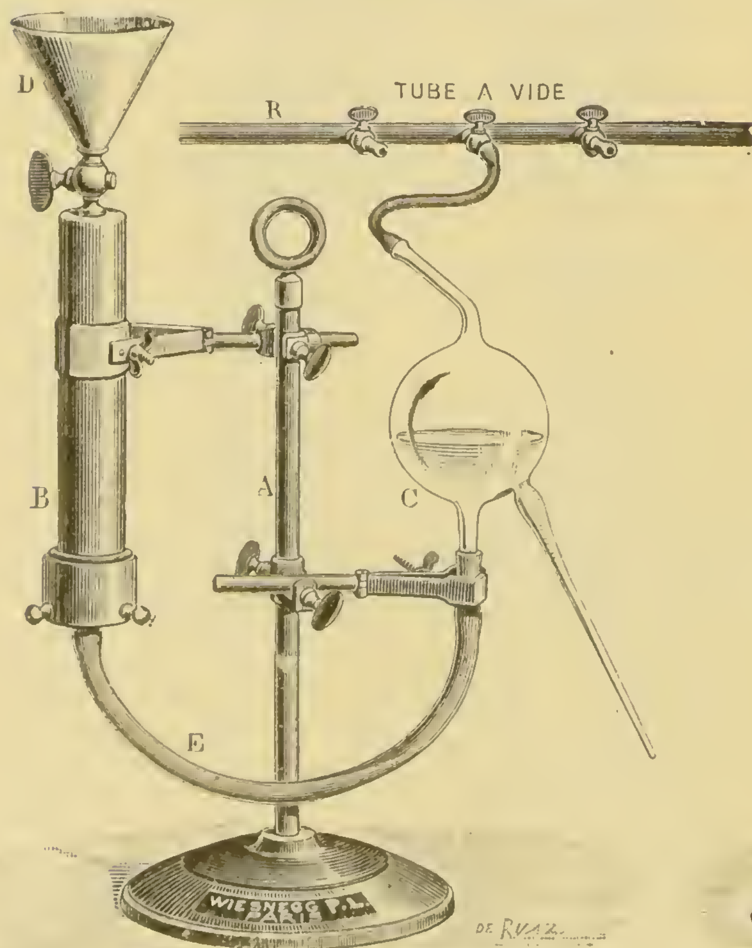


Fig. 105. — Appareil à filtration de L. Martin.

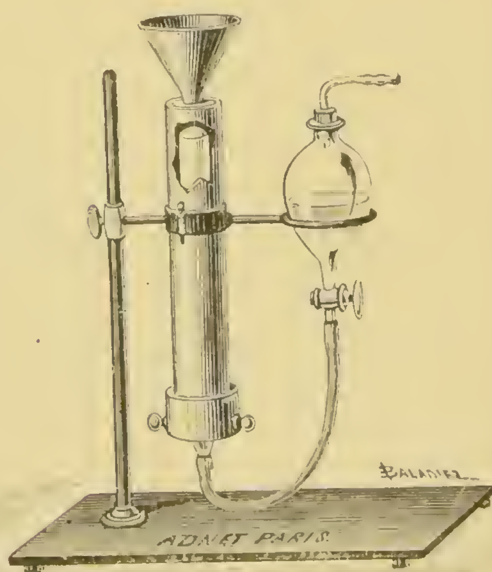


Fig. 106. — Appareil à filtration (Adnet).

ballon à trois tubulures B. La bougie est reliée au ballon par un tube en caoutchouc disposé comme le représente le dessin. La bougie, le tube

en caoutchouc et le ballon sont stérilisés dans l'autoclave à 120°. Une tubulure latérale du ballon, la plus mince, est fermée, l'autre obturée par un tampon d'ouate. On fait plonger la bougie dans l'éprouvette E

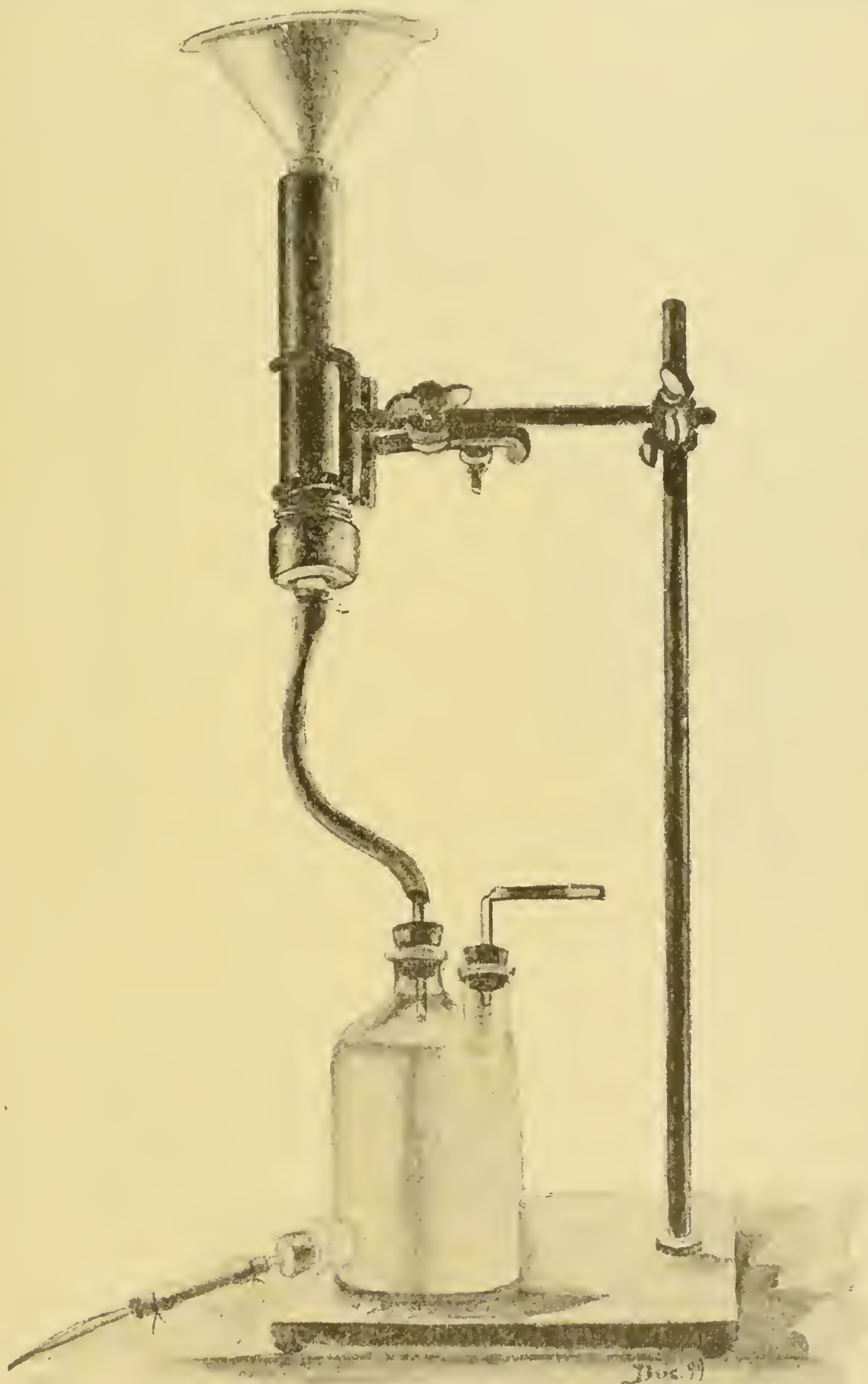


Fig. 107. — Appareil à filtration.

et l'on raréfie l'air du ballon avec la pompe. Le liquide passe dans un ballon, où l'on peut directement l'utiliser ou le répartir dans des vases stérilisés, en employant les précautions nécessaires pour éviter la contamination.

Le petit appareil représenté figure 103, et imaginé par Kitasato, connu sous le nom de *filtre Kitasato*, n'est qu'un perfectionnement de celui de Duclaux représenté figure 101. Le liquide se met dans l'entonnoir supérieur qui se termine par une bougie filtrante soigneusement réunie au flacon récepteur par un bon bouchon de caoutchouc ; la tubulure latérale de ce flacon sert à faire agir une aspiration.

En se servant de très petites bougies, que l'on trouve aujourd'hui facilement dans le commerce, et, comme réservoir, d'un fort tube à essai avec une tubulure latérale, on peut se faire de petits appareils commodes pour opérer sur de faibles quantités de liquide.

L'appareil de Reichel (fig. 104) est plus simple et plus commode. Le flacon de verre est muni de deux tubulures dont l'une est reliée à la machine à vide, l'autre sert à soutirer le liquide filtré. Le liquide se place directement dans la bougie de porcelaine, plus grosse, dont l'extrémité aplatie s'adapte au col du flacon au moyen d'un disque d'amiante interposé et d'un petit collier de caoutchouc. Le vide rend l'application parfaite.

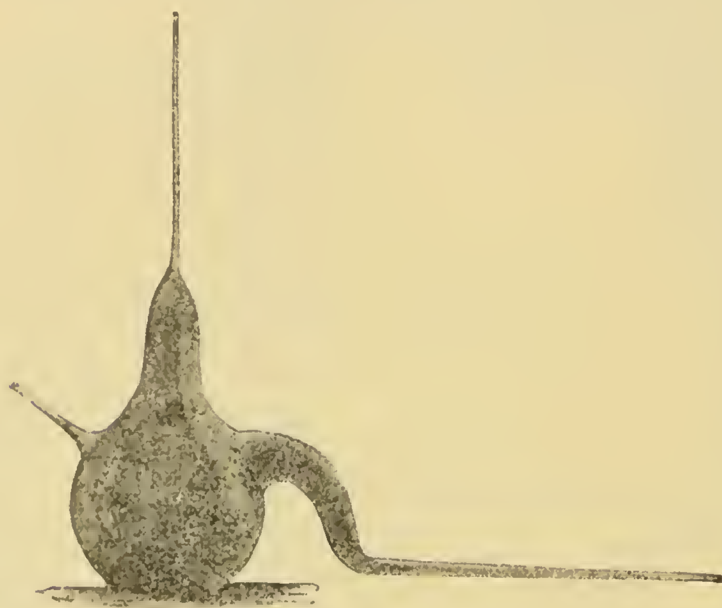


Fig. 108. — Pipette pour filtration.

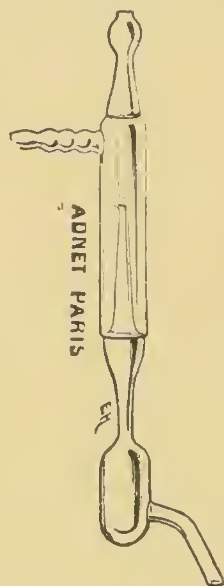


Fig. 109. — Trompe à eau

Pour ces filtrations avec aspiration, l'appareil de L. Martin est des plus commode à employer ; les figures 105 et 106 en représentent deux dispositions. Il est formé d'un filtre Chamberland ordinaire dont la bougie est reliée par un tube de caoutchouc épais à un vase récepteur dans lequel on peut faire le vide. Sur le manchon métallique du filtre se visse un entonnoir en zinc qui reçoit le liquide à filtrer. Le vase récepteur peut être celui représenté par la figure ; l'aspiration se fait par le tube supérieur. Il est beaucoup plus commode de se servir pour cela d'une pipette Chamberland à deux tubulures, telle que celle qui est représentée figure 108. La tubulure supérieure est réunie à la bougie filtrante par un tube à vide ; la tubulure latérale est réunie à l'appareil d'aspiration. L'aspiration se fait au mieux à l'aide d'une trompe à eau que possèdent tous les laboratoires ; l'appareil figures 109 et 110 est d'un très bon emploi. Le petit modèle représenté figure 109 rend de réels services ; facile à démonter et à monter sur tous les robinets, on peut le mettre rapidement à la place voulue. Lorsqu'on dispose d'une

pression d'eau suffisante, il est facile, à l'aide de ces trompes, d'arriver rapidement à un vide de 70 à 72 centimètres de mercure.

La disposition représentée figure 107 permet de filtrer rapidement de grandes quantités de liquides, en usant d'un flacon à tubulures de contenance suffisante, et de répartir le filtrat à volonté; le tube inférieur, servant à la vidange, peut être, à volonté, muni d'un robinet ou bien d'un tube étiré et scellé.

Tout l'appareil, filtre et vase récepteur, peut être stérilisé en bloc à l'autoclave, ou bien le flacon récepteur peut être stérilisé à part dans le stérilisateur à air chaud et n'être réuni au tube de caoutchouc du filtre qu'au moment du besoin, en prenant les précautions voulues pour ne pas introduire de germes. Il est à recommander de mouiller légèrement la bougie du filtre en la lavant extérieurement et intérieurement avant de le mettre à stériliser; l'action de la température est plus assurée. La tubulure du vase récepteur destinée à être réunie à la trompe doit être munie, avant la stérilisation, d'un tampon d'ouate destiné à éviter l'apport de poussières par le tube qui la réunit à la trompe; ce tampon doit être assez lâche pour laisser passer facilement l'air.

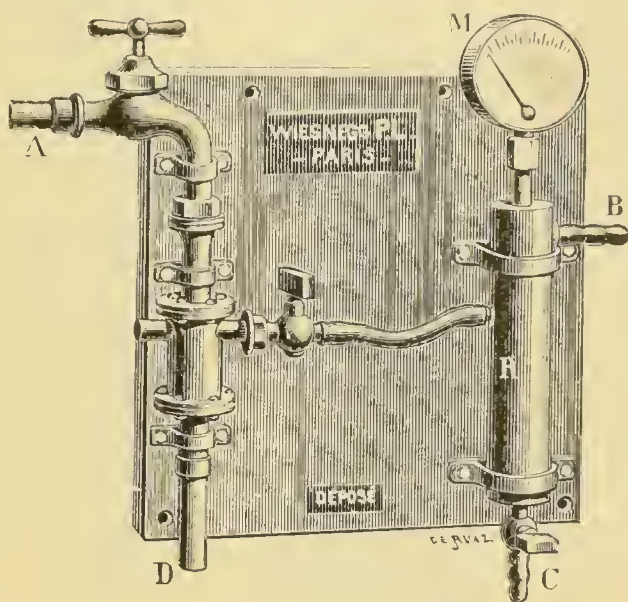


Fig. 110. — Trompe à eau métallique avec réservoir pour éviter les retours d'eau.

L'aspiration nécessaire à employer varie avec la consistance, la viscosité du liquide à filtrer et la résistance de la bougie. Certains liquides filtrent rapidement avec une aspiration de 20 à 40 centimètres de mercure; d'autres ne filtrent que lentement avec une aspiration maxima de 70 à 72 centimètres. Les bougies épaisses et peu poreuses filtrent plus lentement. Pour les liquides troubles qui tiennent en suspension de fines particules, il est à recommander, pour rendre plus rapide la filtration sur bougie, de filtrer d'abord sur papier afin d'enlever les particules qui se déposeraient à la surface de la bougie et diminueraient sa porosité.

Au lieu d'employer l'aspiration pour hâter la filtration sur bougie, on peut se servir de la pression. L'appareil représenté figure 198 conduit déjà à ce but. D'Arsonval a imaginé, pour stériliser les liquides organiques, un appareil (fig. 111) qui permet de joindre à la filtration sur bougie d'alumine l'action microbicide de l'acide carbonique à haute pression. La bougie d'alumine *b* est placée à la partie inférieure d'un manchon de cuivre F qui reçoit le liquide à stériliser et peut être mis par sa partie supérieure en communication avec une bouteille d'acier contenant de l'acide carbonique liquide. On arrive ainsi facilement à faire agir une pression de 40 à 50 atmosphères, montant même à 60 atmosphères si l'on plonge la bouteille à acide carbonique dans de l'eau chaude. Le manomètre M indique la pression. Le liquide qui filtre sort par l'ajutage *a* qui est commandé par la vis V' et peut être recueilli aseptiquement.

Quelle est, au point de vue de la stérilisation des liquides, la valeur de cette filtration sur bougies de porcelaine ou d'alumine? L'expérience démontre que toutes ces bougies se laissent, au bout d'un certain temps, traverser par des microbes et ne peuvent, par conséquent, être considérées comme des filtres parfaits; le temps nécessaire pour que ce passage puisse avoir lieu paraît être de un à trois jours. Avant cette durée, en opérant dans de bonnes conditions, la stérilisation est assurée. Lorsqu'une bougie a servi pour une filtration, il est nécessaire de la nettoyer pour s'en servir à nouveau; les fines particules du liquide qui se sont déposées à sa surface ont pu en partie obstruer ses pores; les liquides albumineux laissent souvent un enduit visqueux, adhérent, qui fait obstacle à la filtration. Il faut laver la bougie sous un courant d'eau, en la brossant avec une brosse dure, puis la passer ou même la laisser séjourner dans de l'eau alcalinisée ou acidulée, selon la nature de la substance qui a filtré. On peut même être obligé, pour lui rendre sa perméabilité, de la chauffer au rouge sombre dans la flamme d'un bec Bunsen ou, mieux, sur un réchaud à charbon. Toute bougie, avant l'usage, devra naturellement être éprouvée avec soin, pour s'assurer qu'elle ne porte aucune fissure. Pour ce faire, on plonge dans l'eau la bougie à essayer et l'on y comprime de l'air à l'aide, par exemple, de la petite pompe de l'appareil représenté figure 102 ou de tout autre moyen. A la moindre fissure, on voit de petites bulles d'air sortir à l'endroit voulu.

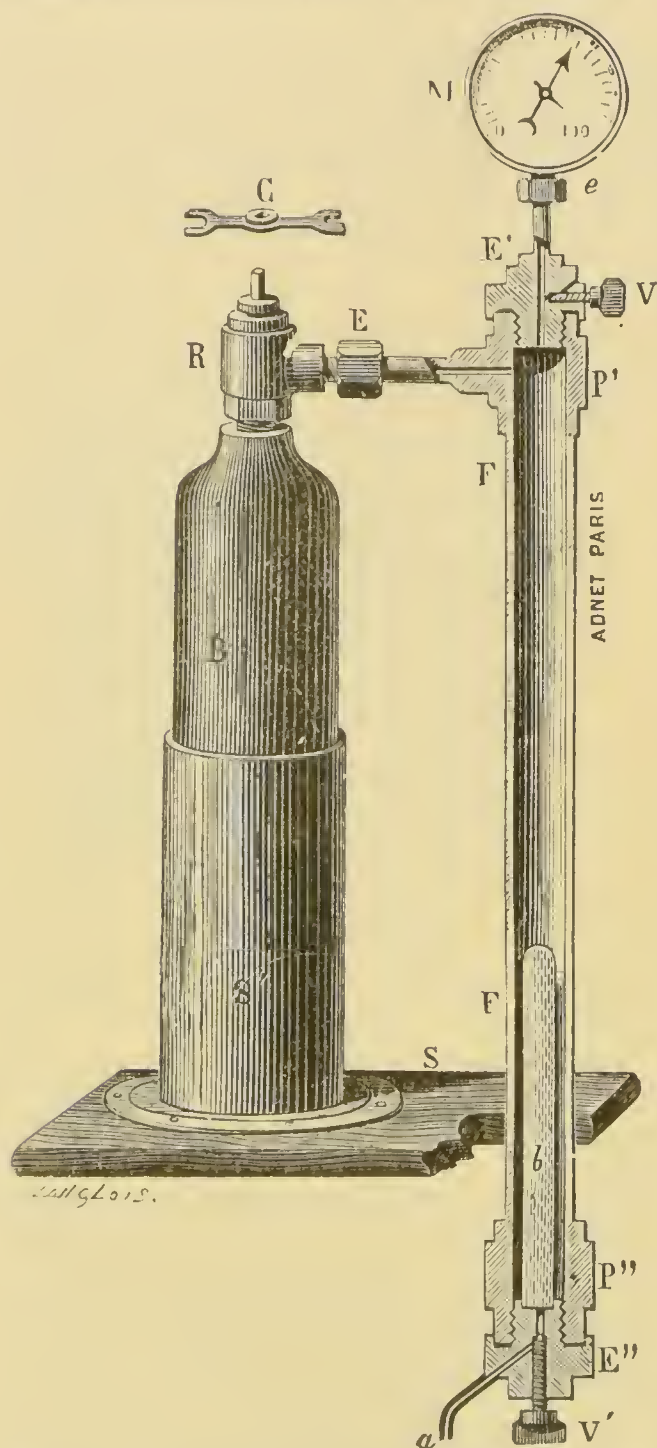


Fig. 111. — Appareil à filtration de d'Arsonval (Adnet).

Ces procédés de *stérilisation par filtration* ne sont cependant pas sans exercer une influence sur la composition chimique des liquides sur lesquels on opère. Il semble au contraire se produire, avec certaines substances, des modifications très importantes, dues probablement à des phénomènes de dialyse. D'après Duclaux (1), le lait ainsi traité laisse sur la bougie filtrante une bonne partie de sa caséine sous forme d'un

(1) Duclaux, Le lait, p. 191.

enduit visqueux blanc grisâtre. Le liquide qui passe est modifié dans son aspect et dans sa composition.

Le sérum du sang filtre facilement avec une assez forte aspiration, surtout lorsqu'il ne contient pas de globules qui, en se déposant sur la bougie, diminuent sa porosité. La filtration est plus rapide si l'on opère à une température un peu élevée, vers 40° à 50° surtout. C'est un moyen simple et sûr de se procurer du sérum stérilisé lorsqu'on ne peut pas recourir à la saignée aseptique et qu'on veut éviter la stérilisation par chauffages répétés, toujours longue et donnant une certitude moindre. Malgré la séparation de certains principes albumineux qui restent sur la bougie sous forme d'un enduit visqueux, les propriétés du milieu n'en paraissent pas modifiées.

Il est cependant des substances sur lesquelles la bougie de porcelaine peut agir, bien que formée d'une matière absolument inerte. Ses effets peuvent être purement physiques; corps éminemment poreux, elle semble, comme tous les corps poreux, avoir plus d'attraction pour certaines substances; elle les retient avec plus ou moins de force, elle les condense pour ainsi dire et peut alors appauvrir d'autant le liquide qui a filtré. Ou bien les modifications sont plus profondes et aboutissent à une véritable transformation ou même destruction de certains produits; ces effets sont dus probablement à l'action oxydante de l'oxygène de l'air qui remplit les pores. Cette influence est particulièrement sensible sur ces substances albuminoïdes d'origine microbienne que nous avons nommées *toxines*, sur les *antitoxines*, sur des produits de propriétés similaires comme les virus. Les recherches de Dzierzgowski (1) prouvent que la filtration sur bougie affaiblit quelque peu l'activité des liquides renfermant des produits toxiques microbiens; cette action toutefois n'est bien sensible qu'au début d'une filtration; elle a donc peu d'importance lorsque la quantité du liquide à filtrer est tant soit peu considérable. L'effet produit sur les venins, observé par Phisalix (2), est plus marqué, peut-être à cause de la plus grande richesse en principes actifs. La bougie sur laquelle on filtre du venin de vipère retient, d'après lui, la substance toxique, de telle sorte que le venin filtré ne tue plus le cobaye, même à forte dose; de plus, ce qui est du plus haut intérêt, ce liquide vaccine les cobayes à l'égard du venin total. Il y aura peut-être là l'indication d'une méthode facile de préparation de produits vaccinants microbiens.

On sait, d'après les recherches de Nocard et Roux sur la péripneumonie bovine, qu'il existe des microbes d'une ténuité telle qu'ils traversent les pores de la plupart des bougies filtrantes (Voy. p. 16). Il est bon de se souvenir de ce fait et de choisir alors, quand cela est nécessaire, les bougies les moins poreuses, la bougie Chamberland B, par exemple, qui peut alors bien filtrer en une telle occurrence.

4. STÉRILISATION PAR LES GAZ SOUS FORTE PRESSION

Dans l'appareil à filtration de d'Arsonval décrit précédemment (p. 270), nous avons vu intervenir l'acide carbonique à forte pression, 40 à

(1) Dzierzgowski, Sur la filtration des substances albuminoïdes à propriétés actives (*Arch. des sc. biol. de l'Inst. imp. de méd. de Saint-Pétersbourg*, IV, 1895, p. 225).
(2) Phisalix, *C. R. de l'Acad. des sc.*, 1896.

50 atmosphères et plus. D'après ce savant, l'action microbicide de ce gaz est certaine dans ces conditions. Pour les substances qu'on ne peut pas soumettre à la filtration, il a imaginé l'appareil représenté figure 112. C'est un petit autoclave de bronze dans lequel se placent les substances à stériliser contenues dans des vases ouverts ou obturés avec un tampon d'ouate très lâche. Les vases ouverts peuvent être terminés par un tube de verre libre, recourbé vers le bas pour éviter la contamination par les poussières de l'air. L'appareil se réunit à la bouteille à acide carbonique liquide, comme il a été dit pour le filtre page 270. On obtient facilement 40 à 50 atmosphères ; en plongeant l'appareil dans de l'eau chaude, la pression monte notablement plus. D'après Sabrazès et Bazin (1), l'action microbicide de l'acide carbonique à ces hautes pressions serait encore douteuse et certainement parfois insuffisante.

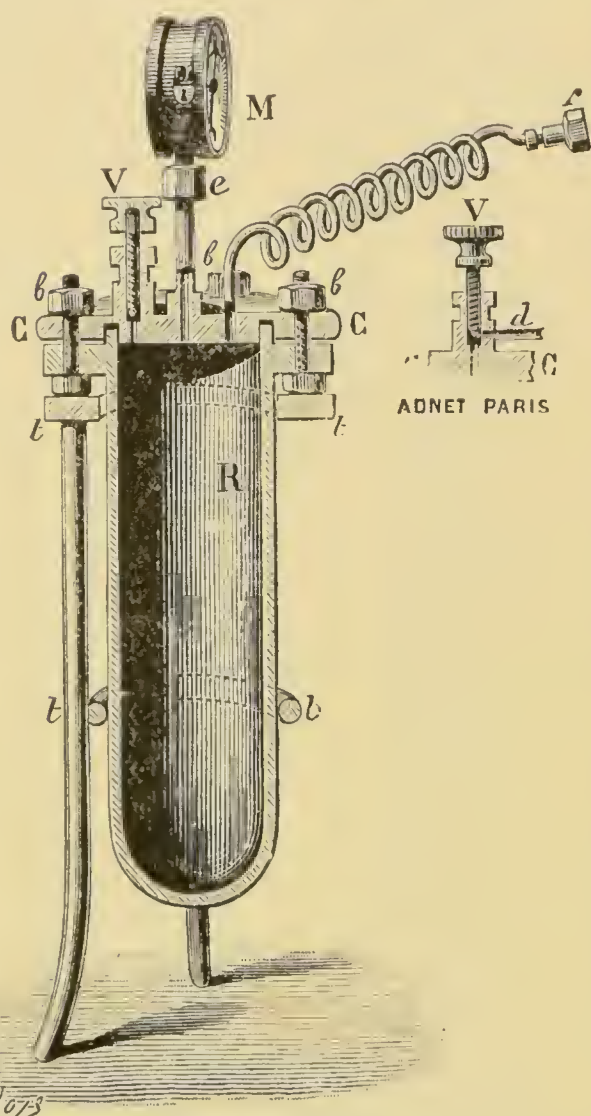


Fig. 112. — Autoclave de d'Arsonval pour stériliser et conserver les liquides organiques.

Les milieux stérilisés doivent souvent être conservés pendant un temps assez long, surtout ceux que l'on prépare par provision, en quantité assez grande. Dans ce cas, la fermeture du vase au moyen d'une simple bourre de coton est insuffisante. L'évaporation n'est pas empêchée, les poussières tombent sur le coton, des germes peuvent à la longue y végéter et venir contaminer le milieu intérieur. Il est très utile d'obturer les vases à l'aide d'un capuchon de caoutchouc, bien stérilisé à l'autoclave, puis séché, ou simplement, lorsqu'on ne redoute pas trop l'évaporation, de coiffer le col du vase d'un cornet de papier à filtrer préalablement stérilisé, comme le vase, à l'autoclave ou dans l'étuve sèche. Tous les vases que l'on désire bien préserver doivent être stérilisés à sec au préalable, munis d'un semblable cornet protecteur.

4° Pratique des cultures.

Les milieux de culture étant obtenus comme il vient d'être indiqué, il faut les disposer de la façon la plus favorable au développement de l'espèce que l'on veut y faire vivre et à l'observation de la culture.

(1) Sabrazès et Bazin, *Gazette hebd. de Bordeaux*, 1893, p. 411

Les liquides sont placés dans des vases de formes variées devant réunir quelques conditions que la pratique apprendra vite à connaître. Ces vases doivent être appropriés au développement, offrir de l'espace et de l'air en suffisance, si l'espèce en a besoin ; commodes pour l'observation, en tant que possible, et disposés au mieux pour favoriser la conservation de la culture, en s'opposant à la pénétration de germes étrangers, en empêchant une évaporation trop rapide, etc.

Les milieux solides, qui fondent à la chaleur, sont coulés à chaud dans les mêmes récipients. On y dispose les autres, après les avoir partagés en morceaux.

La forme, la contenance des vases qui doivent servir, importent peu au succès des expériences. L'observateur peut les choisir telles qu'il lui plaira ou surtout telles qu'elles lui paraîtront mieux convenir à ses recherches. Il suffit que les appareils remplissent les conditions qui viennent d'être énoncées. La pratique a cependant démontré les avantages de certains procédés ; ce sont ceux-là que nous décrirons avec quelques détails. Il est toujours prudent de stériliser d'avance à l'autoclave ou au stérilisateur à air chaud les vases qui doivent recevoir les milieux. Cette stérilisation est naturellement obligée lorsqu'on doit y transvaser des milieux déjà stérilisés.

1. CULTURES EN VASES FERMÉS

Cultures en tubes à essai. — Ce sont celles que l'on emploie le plus communément dans les recherches de bactériologie, lorsqu'on a affaire à des espèces pures, parfaitement isolées, que l'on veut multiplier et dont on veut étudier les particularités de développement. On se sert de tubes à essai ordinaires, ayant 1^{cm},5 ou 2 centimètres de diamètre, à fond rond ou droit. Les derniers se placent facilement debout sur les tables ; c'est leur seul avantage. Il est à recommander de stériliser à l'avance les tubes munis de leur bouchon d'ouate, dans le stérilisateur à air, à 150° au moins. Ces tubes sont garnis d'une quantité de masse nutritive, bouillon, gélatine, gélose ou sérum, variable suivant leur contenance. On y met à peu près une dizaine de centimètres cubes de gelée, de quoi remplir le quart ou le tiers inférieur. La gelée fondue est distribuée dans ces tubes à l'aide d'un entonnoir chauffé d'avance à l'eau bouillante pour éviter une solidification trop rapide. L'opération se fait très rapidement en se servant d'un entonnoir à robinet ou, à défaut, d'un entonnoir simple, muni inférieurement d'un tube de caoutchouc portant une pince à pression et terminé par un embout de verre. L'appareil à filtration à chaud (fig. 113) peut parfaitement servir. On en comprend le fonctionnement ; les mêmes dispositions sont applicables à des instruments plus simples. La gelée nutritive est répartie dans les tubes à simple vue, à moins qu'il soit utile de n'en prendre qu'une quantité exactement déterminée, dans quelques cas spéciaux, par exemple. Il faut éviter le plus possible de laisser tomber de la gelée sur la paroi interne du tube, à l'endroit où doit se placer la bourre ; par dessiccation, le bouchon d'ouate adhérerait au verre et pourrait gêner dans des opérations ultérieures. Les tubes sont fermés avec un tampon d'ouate hydrophile, qui ne doit être ni trop serré ni trop lâche, mais entrer à frottement un peu dur. En dernier lieu, ils sont portés dans l'appareil

à stérilisation. Une heure ou une heure et demie de séjour dans le stérilisateur à vapeur, ou vingt minutes à 120° dans l'autoclave, suffisent amplement pour fournir un résultat certain. Lorsqu'on ne possède qu'une modeste installation, un simple bain-marie peut servir. On y maintient les tubes immergés le plus possible, tout en ne laissant pas l'eau mouiller le tampon d'ouate, et l'on règle la chauffe de manière à éviter une ébullition tumultueuse qui projetterait du liquide sur les bourres. Il est alors plus sûr de recommencer une seconde fois la même opération à un ou deux jours d'intervalle en employant la méthode du chauffage discontinu. Qu'on use des stérilisateurs ou du bain-marie, il

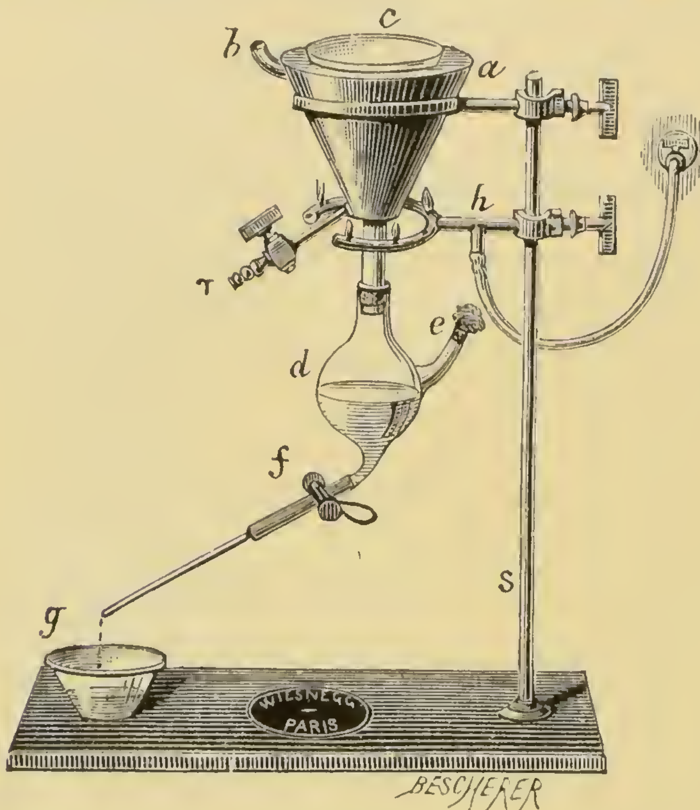


Fig. 113. — Appareil à filtration à chaud.

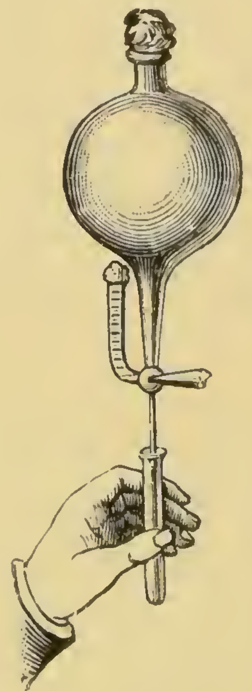


Fig. 114. — Appareil de Treskoff pour mesurer les quantités de milieu.

est prudent de recouvrir les tubes d'un linge fin plié pour empêcher la vapeur de trop imbiber le tampon qui les ferme.

Lorsqu'on veut disposer d'une plus grande surface, on se sert de tubes de diamètre fort, 4 à 5 centimètres par exemple.

Pour augmenter la surface libre des gelées sur laquelle doit s'étaler la colonie, on incline les tubes chauds dès leur sortie du stérilisateur et on les laisse refroidir dans cette position. La partie libre du milieu coagulé présente un biseau d'autant plus allongé que l'inclinaison a été plus prononcée. Il faut naturellement éviter d'arriver au contact du tampon d'ouate. Ceci s'obtient très facilement en disposant des tubes presque à plat sur de larges cuvettes remplies de sable, dans lequel on les enfonce plus ou moins pour arriver au degré d'inclinaison voulu, ou simplement en les maintenant inclinés sur une surface plane au moyen d'une règle ou d'une baguette de verre.

Si l'on veut mesurer exactement la quantité de milieu à employer, on peut se servir d'une seringue graduée, de pipettes jaugées ou, mieux, d'un petit appareil muni d'un robinet à double jeu, tel que celui représenté figure 114.

Les tubes refroidis, droits ou inclinés, sont prêts à servir. On les garde dans un vase de verre fermé d'un couvercle, pour empêcher une trop rapide évaporation d'eau qui rendrait la surface du milieu sèche et peu propice au développement des colonies. On peut aussi, pour le même motif, les recouvrir de petits capuchons de caoutchouc ou d'une mince feuille de papier d'étain, excellents pour s'opposer à la dessiccation, qui rendent surtout de grands services pour les cultures à température assez élevée, en étuves.

Pour éviter ce même inconvénient, on se trouvera souvent bien de fermer les tubes, au lieu d'un simple tampon d'ouate, d'un bon bouchon de caoutchouc traversé par un petit tube de verre d'un faible diamètre dans lequel est légèrement tassée une mèche d'ouate. La déperdition de liquide se fait moins facilement, mais la fermeture est moins assurée.

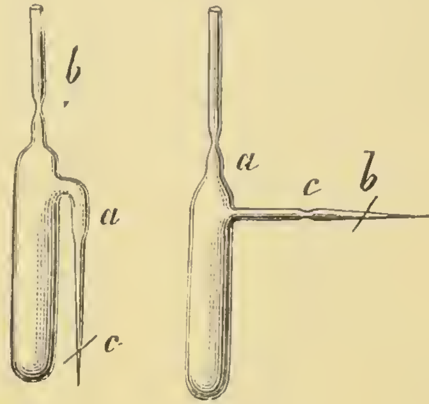


Fig. 115. Fig. 116.

Fig. 115 et 116. — Tubes employés au laboratoire de Pasteur pour les cultures dans les bouillons.

Lorsqu'on veut mesurer exactement la quantité de milieu à introduire dans le tube, on peut se servir d'une simple pipette graduée ou, mieux, d'une burette graduée munie d'un robinet ou d'une pince de Mohr. On a imaginé des appareils plus commodes où la répartition se fait rapidement et exactement au moyen d'un robinet à trois voies.

Les appareils représentés figures 115 et 116 peuvent rendre de très grands services. Ils sont surtout employés au laboratoire de Pasteur, pour les cultures dans les bouillons. Ce sont des tubes en verre assez épais dont le col est étiré et porte un étranglement (*b*, fig. 115, et *a*, fig. 116). Ils sont munis d'une effilure latérale horizontale (fig. 116) ou recourbée verticalement en bas (fig. 115). On introduit un tampon d'ouate dans le col et on le pousse jusqu'à l'étranglement. Les tubes sont stérilisés à sec à haute température, 150°, pendant une heure ou deux. Pour les remplir, après refroidissement on sépare d'un trait de lime la pointe de l'effilure et l'on fait entrer le liquide stérilisé en aspirant par l'autre ouverture. L'orifice de l'effilure est rebouché aussitôt à la flamme. Dans ces petits appareils, on peut facilement faire le vide, en réunissant le col à une trompe ; l'effilure latérale sert à laisser entrer un gaz inerte, de l'hydrogène ou de l'azote. L'ensemencement se fait en brisant la pointe de l'effilure et en introduisant par aspiration un peu de liquide contaminé.

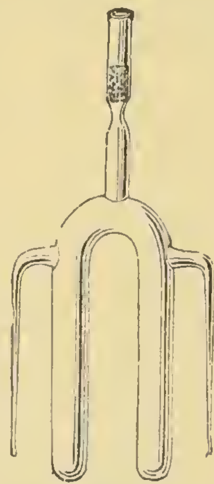


Fig. 117. — Tube à réservoir double.

Les tubes à réservoir double, comme celui de la figure 117, ont aussi leur utilité. On aspire le liquide stérilisé après avoir cassé la pointe d'une effilure et on le répartit entre les deux branches. L'appareil a été stérilisé d'avance comme les précédents. On peut facilement n'ensemencer qu'un seul côté en aspirant un peu de liquide chargé de germes par une effilure ouverte. L'autre côté sert de témoin. En inclinant le tube et en y laissant passer une faible quantité de liquide de culture, on observe

un nouveau développement. Il est possible d'ensemencer chacune des deux branches avec une espèce différente ; les comparaisons sont ainsi faciles à établir. Chaque branche peut enfin recevoir un liquide spécial et les deux être inoculés avec la même espèce ou des espèces diverses. Ces tubes se placent en séries sur des supports de bois faciles à construire.

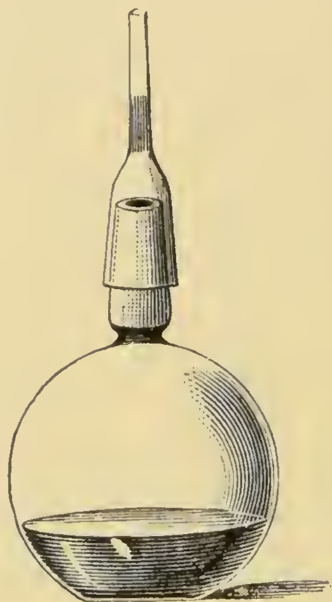


Fig. 118. — Matras Pasteur.

Cultures en ballons. — Les ballons servent surtout pour les cultures dans les différents milieux liquides signalés.

On peut employer les ballons ordinaires à fond plat, de capacité variant suivant le besoin. Le col en est bouché avec un bon tampon d'ouate, entrant à frottement dur sans toutefois trop serrer. Dans de tels ballons, l'évaporation se fait assez vite, surtout en étuve.

La forme représentée figure 118, connue dans les laboratoires sous le nom de *matras Pasteur*, est à recommander. Un couvercle rodé à l'émeri se place sur le col également rodé ; il se termine par un tube de faible diamètre que l'on bouche avec un petit tampon d'ouate indiqué sur la figure. On remplit l'appareil au tiers ou à moitié à l'aide d'un entonnoir. Pour éviter une adhérence trop forte du couvercle, il est bon de graisser le col avec un peu de vaseline au sublimé après remplissage. Ces ballons se renversent facilement ; aussi a-t-on proposé de les remplacer par des fioles à fermeture semblable, mais à panse cylindrique ou cylindro-conique. On en fait aussi à fond plat et large pour les cultures qui demandent une large surface.

Les vases appelés *ballons d'Erlenmeyer*, à fond large et plat, sont d'un

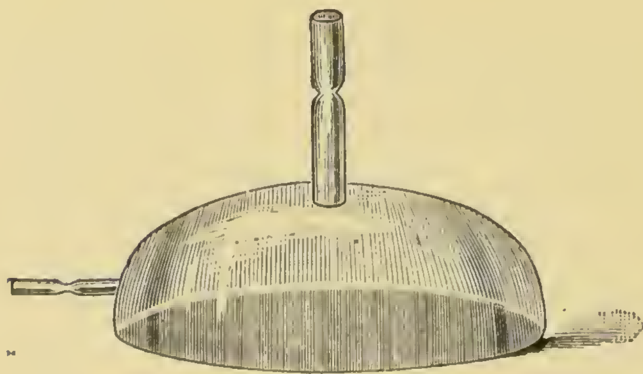


Fig. 119. — Ballon Fernbach.



Fig. 120. — Ballon Petrusky.

excellent usage et coûtent bien moins cher; cependant ils s'opposent bien moins à l'évaporation du liquide que le modèle Pasteur. Les formes représentées figures 119 et 120 permettent d'obtenir des cultures sur de larges surfaces et de faire intervenir un courant d'air ou d'un gaz quelconque.

Il est parfois utile d'user de ballons dont le col a été étiré au chalumeau (fig. 121). Pour les remplir, après les avoir stérilisés dans l'air chaud, puis laissé refroidir, on ouvre la pointe d'un trait de lime et l'on

chauffe légèrement le ballon. En plongeant cette pointe dans le liquide nutritif, celui-ci pénètre dans l'intérieur par suite de la diminution de pression déterminée par le refroidissement. La pointe est fermée au chalumeau et le ballon mis à stériliser. L'appareil figure 122, connu sous le nom de *pipette Chamberland*, est infiniment plus commode pour conserver les liquides stérilisés et les répartir ensuite dans d'autres vases sans avoir de contamination à craindre et, dès lors, de nouvelle stérilisation à faire. On bouche le col courbé du ballon avec un tampon d'ouate poussé dans son étranglement et l'on stérilise dans le four à flamber ou l'étuve sèche. Après refroidissement, la pointe du prolongement latéral effilé est coupée à la lime et plongée dans le liquide dont on veut se servir, stérilisé ou recueilli pur de germes ; on remplit en aspirant par l'orifice du col. La pointe est refermée dans la flamme. Il est très facile de puiser du liquide, resté pur ou dans lequel s'est développée une espèce ensemencée. Il suffit d'ouvrir l'effilure et d'en faire couler la quantité voulue en inclinant le vase.

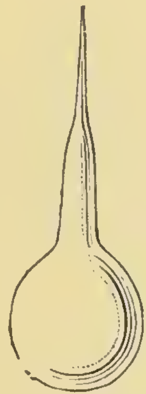


Fig. 121. — Ballon à col étiré.

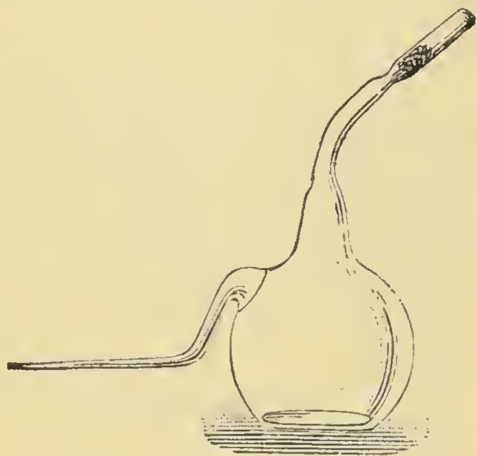


Fig. 122. — Ballon-pipette Chamberland.

On peut se servir de ballons pour des cultures sur des milieux solides, lorsqu'on désire user d'une large surface. On les garnit d'une couche de 1 à 2 centimètres d'épaisseur de gelée, de bouillie de pomme de terre, etc. ; on les ferme avec de la ouate et on les stérilise comme les tubes à essai qui contiennent ces mêmes substances.

Cultures en tubes clos. — Pasteur (1) usait, dès 1865, pour cultiver en vase clos les espèces dont il étudiait l'action physiologique, de petites lentilles de verre soufflé, fabriquées pour lui en Allemagne par Geissler. L'appareil complet consistait en un tube de petit diamètre sur la longueur duquel était soufflée une lentille plate dont les deux surfaces se trouvaient très rapprochées l'une de l'autre à la partie centrale ; elles n'étaient distantes en ce point que de quelques dixièmes de millimètre. Le tube était rempli de liquide ou n'en contenait qu'une faible quantité, venant se réunir en gouttelette dans la partie centrale déprimée de la lentille. On peut ainsi observer le mode de vie, la multiplication à l'air ou sans air. Tout l'appareil se place facilement sur la platine du microscope et supporte l'emploi des plus forts grossissements, lorsque les parois sont obtenues suffisamment planes et d'une même épaisseur que celle des lamelles couvre-objets.

Salomonsen (2) s'est servi de tubes très fins obtenus en étirant des tubes de verre de 4 à 5 millimètres de diamètre. Il y introduisait un liquide nutritif contenant des germes dont il observait le développement

(1) Pasteur, Études sur la bière, 1876, p. 153, note.
(2) Salomonsen, Zur Isolation differenten Bacterienformen (*Bot. Zeit.*, 1886).

au microscope. La méthode est certainement à reprendre. Vignal(1), nous le verrons plus loin, en a fait l'application à la culture des anaérobies.

Cultures sur pommes de terre. — C'est un excellent milieu de culture pour les Bactéries. Les caractères de cultures sur ce milieu sont parfois assez particuliers pour fournir un appoint important à la diagnose de quelques espèces. L'aspect des colonies y est très varié. Ce sont en général des revêtements épais, visqueux, incolores ou nuancés de teintes plus ou moins vives, suivant l'espèce. Parfois, c'est une couche mince transparente, qu'on ne distingue que difficilement de la substance du tubercule ; c'est le cas du *Bacille typhique*, de certains *Streptocoques*. Les Bactéries chromogènes végètent d'ordinaire très bien sur les pommes de terre ; elles y présentent souvent une coloration plus intense que sur les autres milieux.

Les pommes de terre, préparées comme il a été dit page 251, sont coupées en deux ou plus, suivant leur volume, à l'aide d'un couteau stérilisé, et les morceaux déposés soit isolément dans de petits cristallisoirs couverts stérilisés à l'étuve à air chaud, au fond desquels est une rondelle de papier buvard imbibé d'eau bouillie ou un tampon d'ouate stérilisée mouillée d'eau préalablement bouillie, soit plusieurs ensemble dans des cristallisoirs formant chambre humide. L'inoculation se fait en stries à la surface, à l'aide du fil de platine préalablement rougi dans la flamme, puis refroidi. Les cristallisoirs sont placés à l'étuve.

Les contaminations, si faciles dans ces cultures, sont évitées en se servant de morceaux allongés de pommes de terre crues qu'on introduit dans de gros tubes à essai bouchés d'ouate, qui peuvent même recevoir facilement une moitié de pomme de terre de moyenne taille. Chaque moitié de pomme de terre, bien lavée à l'eau et pelée, est placée dans un de ces tubes au fond duquel se trouve un tampon d'ouate destiné à absorber l'eau en excès et à maintenir l'humidité. Ces tubes, bouchés par de forts tampons d'ouate, sont stérilisés à 120°, dans l'autoclave ; on les y laisse trente minutes environ pour cuire suffisamment les pommes de terre. Après refroidissement, ils sont ensemencés et coiffés d'un capuchon de caoutchouc ou d'une capsule en étain. Les inoculations se font exactement comme pour les cultures en tubes. Les cultures ainsi faites peuvent se conserver très longtemps à l'étuve ; le tampon mouillé qui se trouve au fond empêche une dessiccation trop rapide. Roux (2) a indiqué une méthode semblable qui peut être parfois avantageuse. Il se sert de gros tubes portant un étranglement vers le quart inférieur. L'étranglement arrête la pomme de terre et la cavité inférieure qu'il limite recueille le liquide qui pourrait gêner. Il est en outre facile de souder une tubulure à la partie inférieure, au-dessous de l'étranglement, ce qui permet de faire le vide dans le tube ou d'y laisser arriver un gaz quelconque. L'appareil n'est guère plus commode et est plus coûteux que le précédent.

On a employé la bouillie obtenue en broyant les pommes de terre avec un peu d'eau. On en peut garnir le fond d'un flacon d'Erlenmeyer, qu'on stérilise ensuite à la vapeur.

(1) Vignal, Sur un moyen d'isolation et de culture des microbes anaérobies (*Ann. de l'Inst. Pasteur*, I, 1887, p. 358).

(2) Roux, De la culture sur pomme de terre (*Ann. de l'Inst. Pasteur*, 1888, n° 1).

On prépare de même des cultures sur autres substances amylacées, empois d'amidon, pâte de pain, riz cuit, carottes, etc.

Cultures sur porte-objet. — Lorsqu'on veut suivre, sous le microscope, pendant un temps assez long, le développement des Bactéries, il faut recourir à un dispositif qui permette l'observation à tout instant en même temps qu'il n'entrave en rien les conditions de nutrition indispensables à la vie.

L'usage de cellules de verre, employées depuis longtemps pour l'étude des Champignons inférieurs (1), répond à toutes les nécessités.

Ces appareils consistent en un anneau de verre, de hauteur et de diamètre variables, collé sur un porte-objet à l'aide de baume de Canada ou de tout autre adhésif (fig. 123, C). La cavité ainsi limitée peut être close en haut par une lamelle qui doit s'appliquer exactement sur le bord supérieur rodé de l'anneau B. Il est facile d'en préparer soi-même. On prend un tube de verre épais de 1 à 2 millimètres et, à l'aide d'une lime triangulaire et d'un charbon ardent, on en sépare des segments de 5 à 6 millimètres de hauteur. Ces anneaux sont usés à l'émeri sur les bords de façon à les dresser parfaitement et à les amener à être parfaitement parallèles l'un à l'autre. On colle l'anneau sur un porte-objet en garnissant sa face inférieure d'une légère couche de baume de Canada et on laisse sécher. Une lamelle, qui s'applique sur le bord supérieur enduit de vaseline au sublimé, obture complètement la chambre. En mettant une goutte d'eau pure au fond de la cavité sur le porte-objet et une goutte de bouillon ou de tout autre milieu nutritif (P) sur la face inférieure de la lamelle, on aura à sa disposition un milieu isolé de tout contact extérieur, pouvant suffire à approvisionner pendant un temps assez long les Bactéries qui s'y développent. De plus, l'observation, même au moyen d'objectifs forts, sera possible à tout instant, les cellules se répandant dans le liquide et atteignant vite la face inférieure de la lamelle.

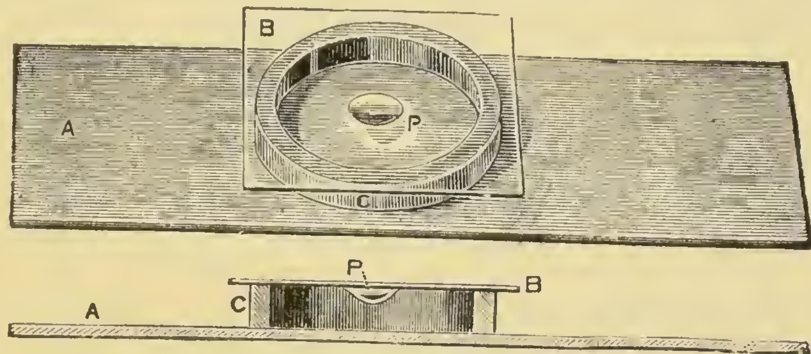


Fig. 123. — Culture en cellule sur porte-objet.

La cellule est rapidement stérilisée dans la flamme ou dans l'alcool à 95° ; à l'aide d'une pipette stérilisée, on dépose au fond une goutte d'eau pure. Le bord libre est enduit de vaseline au sublimé. On passe une lamelle dans la flamme, on y dépose une goutte de bouillon stérilisé et, à l'aide d'un fil de platine préalablement rougi puis refroidi, une très faible parcelle contenant l'espèce à étudier. La lamelle est appliquée sur l'anneau, la face qui porte la goutte tournée naturellement vers la cavité. La couche de vaseline la maintient fixée contre l'anneau de verre et s'oppose en outre à l'entrée de l'air, qui pourrait apporter des germes étrangers. Le développement se fait plus vite à la surface libre de la goutte ; aussi, avec les objectifs à court foyer, doit-on examiner surtout

(1) Van Tieghem et Le Monnier, Recherches sur les Mucorinées (*Ann. des sc. nat., Bot.*, 5e sér., t. XVII, 1873).

les bords de la goutte. Il est préférable d'étaler en premier la matière d'inoculation sur la lamelle et de la dessécher légèrement avant d'y déposer la goutte du liquide nutritif; de cette façon, beaucoup de Bactéries restent accolées à la face inférieure du couvre-objet et peuvent être facilement suivies avec les plus forts systèmes à immersion.

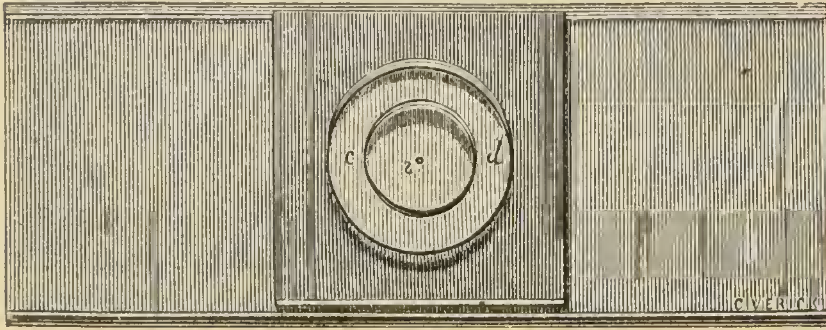


Fig. 124. — Chambre humide de Ranvier.

Ces cellules sont mises en étuve ou laissées à la température ordinaire; il faut, en tout cas, les mettre à l'abri de l'évaporation en les couvrant d'une petite cloche où l'air est saturé de vapeur, ou, mieux, en les disposant dans une petite chambre humide. On s'en construit facilement une avec une boîte en zinc, qui est munie de deux tringles pouvant supporter une rangée de ces cellules porte-objet et dans le fond de laquelle on met de l'eau.

On peut utiliser, pour les mêmes observations, les porte-objets excavés que l'on trouve dans le commerce. La lamelle, munie d'une gouttelette de liquide ensemencé, est retournée sur la cavité de façon que la goutte pende librement. On lute les bords du couvre-objet à l'aide d'une couche de paraffine.

La *chambre humide* de Ranvier (fig. 124) est d'un usage analogue. On met une très petite goutte d'eau stérilisée dans la rigole *d* et la goutte de liquide contenant des Bactéries sur le disque médian *s*, dont le niveau est légèrement inférieur à celui de la surface supérieure du porte-objet. On couvre d'une lamelle stérilisée dont les bords sont lutés avec de la paraffine.

De ces trois appareils, le premier est certainement préférable à cause des dimensions de la cavité de culture qui permet d'user d'une quantité

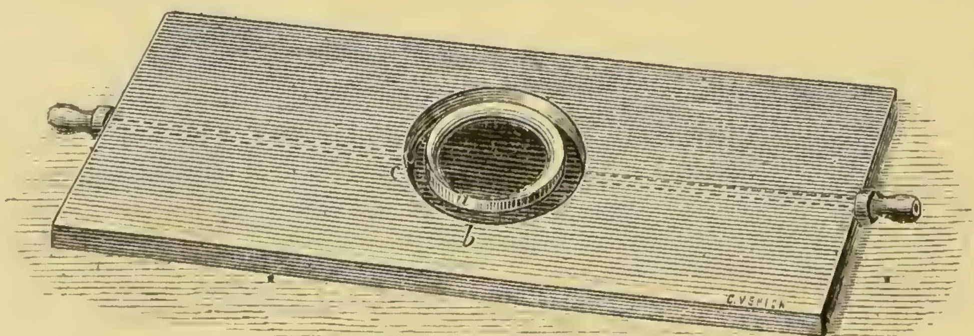


Fig. 125. — Chambre à gaz de Ranvier.

plus considérable de matière nutritive et de laisser plus d'air à la disposition des cellules qui s'y développent. Les deux autres conviennent surtout pour des expériences de peu de durée.

L'observation des Bactéries vivantes par ces procédés donne de très intéressants détails sur leur mode de vie. On y suit sur une même cellule les modifications qu'elle peut subir, la multiplication végétative, la formation des spores, leur germination.

La *chambre à gaz* de Ranvier (fig. 125) permet d'observer sur porte-

objet le développement de Bactéries dans différents gaz. Elle est d'un précieux secours pour l'étude des espèces anaérobies. Une goutte du liquide à examiner est déposée sur le disque de verre *a* et recouverte d'une lamelle qui est lutée à la paraffine sur le porte-objet métallique. Le liquide forme une couche mince entre la lamelle et le disque *a*, qui se trouve à un niveau un peu inférieur. Le courant gazeux passe par les tubulures latérales, dont est muni le porte-objet, et vient circuler dans la rigole *b*, qui entoure le disque *a*.

2. CULTURES SUR PLAQUES

Cette méthode, établie par Koch (1), est une des plus sûres et des plus fructueuses de la Bactériologie. Le principe qui a guidé son auteur a été de disséminer, dans de la gélatine liquéfiée à basse température, les Bactéries contenues dans une parcelle de la substance à examiner, de façon à leur permettre de se développer isolément, lorsque la gélatine refroidie, ayant fait prise, les maintient à distance les unes des autres.

Deux résultats sont surtout à apprécier : l'*isolement* des colonies produites, qui peut être plus ou moins prononcé suivant la quantité de Bactéries que contient la matière d'inoculation, et suivant le degré de dilution qu'on lui a fait subir; la *forme* de ces colonies, qui, issues d'un seul germe, revêtent souvent un aspect véritablement typique. De là, des caractères très importants pouvant être appliqués d'abord à l'obtention de cultures pures et à la vérification des cultures, et en second lieu à la diagnose, encore si difficile, des espèces.

Aussi ne saurait-on trop recommander de se livrer à l'étude approfondie de cette méthode. Au début des études de Bactériologie, elle fournira de nombreux sujets d'examen, surtout fructueux parce qu'ils seront purs; elle familiarisera avec la préparation de cultures *pures*, cette clef de la science des Bactéries ; elle sera, pour celui qui se livre à des recherches sérieuses et approfondies, un moyen précieux de contrôle et une source des plus féconde pour l'observation.

Si l'on ne perd pas de vue le premier but de la méthode, *isolement* des germes suffisant pour empêcher la confusion des colonies qu'ils vont donner en se développant, l'application en sera facile ; l'observateur pourra en varier à son gré les détails, pourvu que le résultat soit obtenu. Il faut amener les Bactéries contenues dans la substance à examiner à être *diluées* dans une quantité de liquide gélatineux telle que, lorsqu'il aura fait prise par refroidissement, elles restent suffisamment écartées les unes des autres pour que les colonies qui doivent en provenir soient faciles à distinguer et empiètent le moins possible sur des voisines. C'est une simple affaire d'appréciation et de tâtonnement. Si l'on ne réussit pas une première fois, on en est quitte pour recommencer en mettant à profit les données de la première observation.

Prenons, comme exemple de la technique générale du procédé, l'examen bactériologique d'une eau de boisson, cas des plus instructif par le grand nombre des espèces que l'on peut rencontrer et la variété

(1) Koch, Zur Untersuchung von pathogenen Organismen (*Mitth. aus dem kaiserl. Gesundheitsamte*, I, 1881), et surtout *passim* dans les *Actes de l'Office imp. de santé de Berlin*.

surprenante des colonies qu'elles donnent en cultures sur plaques, et d'une haute importance pratique au point de vue de la recherche de certaines espèces nuisibles qui peuvent contaminer ce liquide.

Le chiffre des Bactéries que peut contenir une eau varie dans des limites très étendues, en relation directe avec les causes de contamination qui peuvent agir sur elle. Nous passerons toutes ces causes en revue dans la troisième partie de ce livre. Nous supposerons donc avoir affaire à un liquide d'une teneur moyenne en germes, comme le sont beaucoup d'eaux potables des grandes villes; il sera facile ensuite de discuter la marche à suivre dans des conditions différentes.

Le milieu qui va servir est la gélatine nutritive, dont la préparation a été indiquée page 240. La consistance de la gelée, et par conséquent la quantité de gélatine sèche à employer, doit légèrement varier suivant la température du milieu où l'on opère. Il sera presque toujours plus commode de prendre 8 à 10 p. 100 de gélatine ; dans les fortes chaleurs de l'été, il faudra augmenter ce poids et arriver à 12 et 15 p. 100 et même plus, si l'on ne dispose pas de moyens de maintenir la température à un degré assez bas pour que la gelée fasse rapidement prise et se maintienne solide. Il faut éviter d'ajouter à la gélatine qui doit servir aux cultures sur plaques du sel ou du sucre, si favorables cependant au développement des Bactéries ; par suite de la dessiccation de la couche de gelée, il se formerait des amas de petits cristaux très gênants pour l'observation.

Quelques tubes de gélatine bien transparente, stérilisés en toute assurance, sont mis dans un vase contenant de l'eau à une température de 40° environ. La gelée fond rapidement. Par addition d'un peu d'eau froide, on fait tomber la température vers 30°. On s'assure que les bouchons d'ouate des tubes n'adhèrent pas à la paroi ; dans le cas contraire, on les détache en les tordant plusieurs fois sur eux-mêmes, sans arriver à déboucher complètement le tube. On prend, à l'aide d'une mince pipette stérilisée, une petite quantité de l'eau à analyser, qui doit être recueillie avec toutes les précautions convenables d'après des méthodes expliquées plus loin, et qui sera agitée au préalable, afin de répartir au mieux dans la masse les germes qu'elle contient. On débouche un tube et on laisse rapidement tomber une ou plusieurs gouttes de la pipette ; on replace, tout de suite, la bourre d'ouate. Le tube est doucement secoué et roulé entre les doigts pour bien mêler l'eau et la gélatine, en évitant la formation de bulles d'air dans la masse et en ayant soin de ne pas projeter du contenu sur la bourre. On le marque d'un numéro 1, c'est la *dilution originale*. Une *seconde dilution* est obtenue en mélangeant une ou plusieurs gouttes de cette première à la gélatine d'un second tube ; elle est désignée par le numéro 2. Une même quantité de la seconde dilution ajoutée au contenu d'un troisième tube donne une *troisième dilution*, notée avec le chiffre 3. En procédant de la même façon, on peut obtenir des dilutions plus étendues, précieuses lorsque la teneur en Bactéries est élevée.

Les tubes ainsi préparés sont laissés quelques minutes dans de l'eau à une température de 25° environ ; quand ils sont descendus à ce degré, ils peuvent être coulés sur les plaques de verre.

On se servait de plaques de verre de 10 à 12 centimètres de large sur 14 ou 15 de longueur que l'on a stérilisées d'avance dans une boîte métallique (fig. 126), dans le stérilisateur à air chaud. On retire les

plaques une à une, au fur et à mesure du besoin, à l'aide de pinces flambées et en ouvrant la boîte en la maintenant à plat, dans la position horizontale. A la rigueur, les plaques peuvent être simplement stérilisées à la flamme du gaz ou d'une lampe à alcool. On les met à refroidir, la face qui doit être utilisée tournée vers le haut, couvertes par une feuille de papier blanc très propre. On peut aussi les envelopper séparément de papier blanc et les stériliser après. Elles ne sont alors déballées qu'au moment du besoin.

Pour empêcher la gélatine de se répandre irrégulièrement sur la

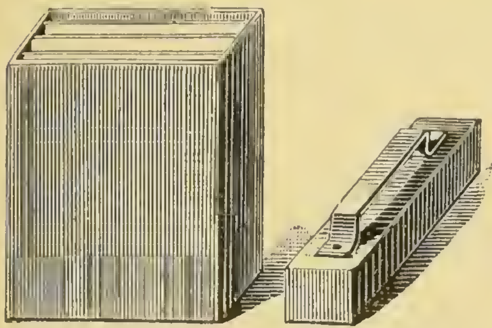


Fig. 126. — Boîte à stériliser les plaques.

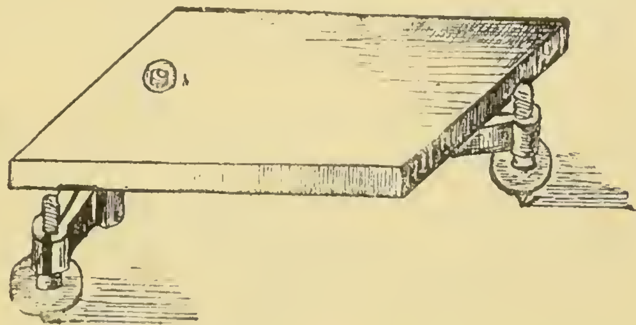


Fig. 127. — Planchette à vis calantes.

plaque et de couler même de ses bords, il faut de toute nécessité disposer d'un support *parfaitement* horizontal. Cette condition s'obtient facilement à l'aide d'une planchette munie de trois vis calantes (fig. 127), que l'on peut disposer à volonté en s'aidant d'un petit niveau à bulle d'air. Les dimensions de 20 centimètres de longueur sur 30 de largeur sont très convenables ; elles permettent de placer sur la planchette à niveau les trois plaques qui servent le plus souvent pour une même opération ; ce qui n'offre aucun inconvénient si l'on va vite.

Lorsque la température est peu élevée, pour amener ou hâter la prise de la gélatine, au lieu de placer la plaque ou les plaques directement sur la planchette, on interpose un réfrigérant. C'est un cristallisoir rempli d'eau glacée et couvert d'une large lame de verre qui sert de support aux plaques. Cette lame est placée parfaitement plane à l'aide d'un niveau à bulle.

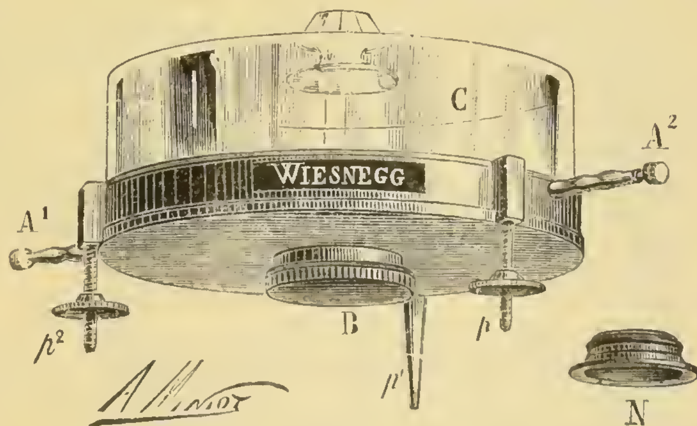


Fig. 128. — Appareil pour plaques de gélatine.

La figure 128 représente un appareil imaginé par Roux pour obvier à cet inconvénient. Il se compose d'une boîte circulaire en cuivre que l'on dispose horizontalement au moyen d'un niveau N et de vis calantes. A^1 et A^2 sont deux tubulures soudées à cette boîte, par où peut passer un courant d'eau froide ou, au besoin, un courant d'eau chaude. Par une large ouverture B, placée sous la boîte et fermée par un bouchon à vis, on peut introduire des morceaux de glace, lorsque cela est nécessaire. Une large cloche recouvre l'appareil.

La table refroidissante d'Ogier (fig. 129), de plus grandes dimensions, peut recevoir un plus grand nombre de plaques et est alors d'un usage plus courant.

On prend un tube où la gélatine encore visqueuse est près de son point de coagulation et, après l'avoir essuyé pour ne pas laisser couler d'eau du bain dans le mélange, on en verse le contenu sur la plaque froide. La gelée s'étale en une tache plus ou moins large suivant qu'elle se prend plus ou moins vite. Il faut éviter de verser trop tôt la gélatine qui s'étend trop et atteint les bords de la plaque ; lorsqu'elle a com-

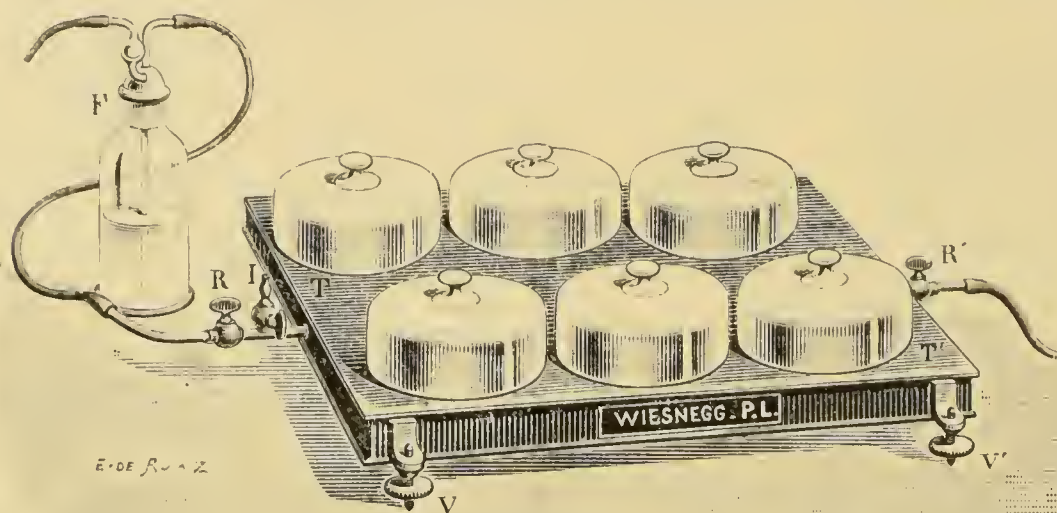


Fig. 129. — Table refroidissante d'Ogier pour cultures sur plaques.

mencé à se solidifier dans le tube, il se forme par places de gros amas très défavorables à l'observation. L'habitude fera bien vite saisir le moment opportun. Il est du reste facile de remédier à l'un ou l'autre défaut en refroidissant ou réchauffant les tubes. On couvre les plaques, isolément ou toutes ensemble, avec une cloche ou un cristallisoir jusqu'à solidification complète de la masse de culture.

Chaque plaque doit être munie d'une étiquette portant les indications nécessaires, indication de l'objet de la culture et numéro d'ordre de dilution. Les plaques sont alors disposées soit isolément au fond d'un cristallisoir couvert stérilisé, où l'humidité est entretenue par un tampon de coton imbibé d'eau bouillie, soit plusieurs ensemble au moyen de combinaisons variées. De petites étagères en cuivre, du modèle de celle représentée figure 130, ou faites en fil suffisamment résistant pouvant supporter trois ou quatre plaques ou même un plus grand nombre, conviennent parfaitement pour cet usage. Elles se placent dans un cristallisoir fermé qui fait chambre humide, ou sous une cloche lorsque l'étagère est haute.

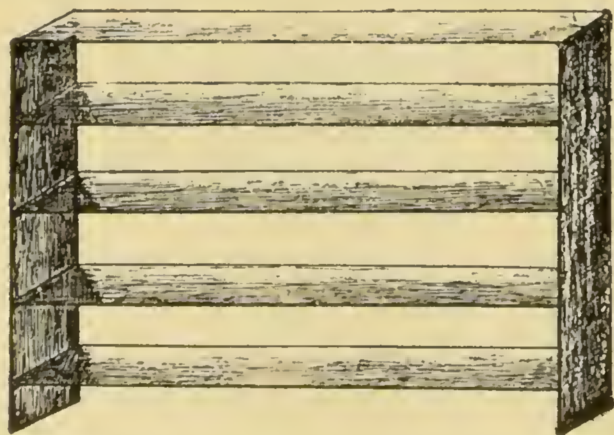


Fig. 130. — Étagère pour plaques.

Il est nécessaire de stériliser avec soin les instruments qui doivent

supporter ou contenir les cultures sur plaques. On ne saurait trop insister sur ce point. C'est de là que viennent, en effet, une grande partie des contaminations de ces cultures. Les objets en verre peuvent être stérilisés par la chaleur ou par un lavage à une solution de sublimé ; ceux en métal doivent être flambés. Il est très commode de se servir d'une boîte en feuille de cuivre, à porte vitrée, contenant une étagère en fil de cuivre assez rigide, à un nombre de places variable suivant la quantité de plaques qu'on veut y renfermer. Les parois internes de la boîte et l'étagère sont, chaque fois, soigneusement flambées avec un bec de gaz que l'on promène sur elles. Ou bien on peut stériliser le tout en bloc dans le stérilisateur à l'air chaud, lorsqu'il est de dimensions suffisantes.

Les cultures sur plaques se font à la température ordinaire, ou dans une étuve réglée de 18° à 19°, lorsque les variations diurnes et nocturnes sont trop considérables. Dans les fortes chaleurs de l'été, on est même obligé d'abaisser la température de l'appareil qui les contient, si l'on veut que la gélatine reste solide. En hiver, pour obtenir 18° environ, il suffit de placer l'étuve à cultures ou plaques tout contre une étuve réglée à 35° environ.

On opère de même pour toute substance contenant des Bactéries, que l'on veut étudier. Pour les matières solides ou visqueuses, terre, poussières, parcelles de culture, pus, sang, etc., il vaut mieux les délayer dans une petite quantité d'eau ou de bouillon stérilisés, avant de les ajouter à la gélatine ; on sépare mieux les germes contenus dans le milieu à examiner, et ils se mélangent plus uniformément à la masse de culture.

Pour certaines cultures, il peut être préférable de se servir d'un milieu liquide pour opérer la dilution. Qu'il s'agisse d'un liquide ou d'une matière délayée dans un liquide, on prend une goutte ou 1 centimètre cube, qu'on ajoute à 10, 100, ... centimètres cubes d'eau ou de bouillon stérilisés ; on mélange intimement et l'on prend, suivant les cas, une goutte ou 1 centimètre cube de cette dilution, pour mêler à la gélatine et faire une culture sur plaques. C'est surtout lorsqu'on a affaire à une substance ne contenant qu'une ou quelques espèces qu'il est avantageux d'opérer ainsi. Lorsque, au contraire, il se trouve de nombreuses espèces mélangées, il est beaucoup plus rationnel de recourir aux dilutions successives, qui se servent, pour ainsi dire, de contrôle et de complément l'une à l'autre.

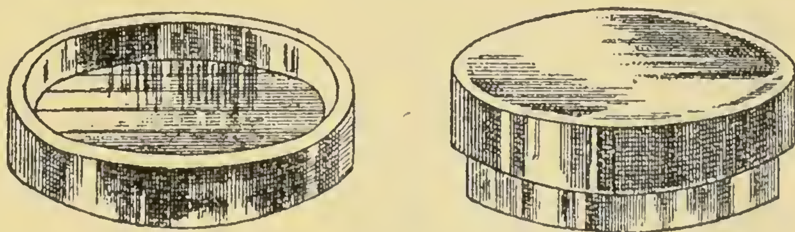


Fig. 131. — Boîtes de Petri.

L'emploi de récipients creux, au lieu et place de plaques planes, offre souvent de grands avantages. Des cristallisoirs bas en verre de Bohême, munis d'un couvercle, peuvent être d'un bon usage ; ils sont aujourd'hui très usités sous le nom de *boîtes de Petri* (fig. 131). Certains modèles ont même une tubulure latérale, bouchée par un tampon de coton, qui permet d'introduire la substance à étudier sans exposer le milieu de culture à être contaminé par la chute des poussières de l'air. On remplit

le même but en faisant, à l'aide d'un lut ou de petites baguettes de verre collées au baume, un rebord aux plaques ordinaires ; mais la stérilisation est alors plus difficile, pour éviter de fondre la substance employée. On s'est aussi servi des vases à fonds plats dits *flacons d'Erlenmeyer*, qui offrent en outre l'avantage de supprimer l'accès de l'air chargé d'impuretés. Les flacons plats dits *boîtes de Roux*, ceux des modèles représentés figures 132 et 133 sont d'un emploi plus commode, surtout parce qu'il est possible de les placer sous le microscope pour étudier les colonies à de faibles grossissements. Il est facile aussi avec elles d'éviter toute contamination par l'air. Mais, avec tous ces modèles, il est très difficile et souvent impossible de pouvoir étudier de près et directement les différentes colonies qui se développent dans la gélatine ; il est surtout trop chanceux de pouvoir se procurer en toute assurance des parcelles de colonies sans léser les voisines.

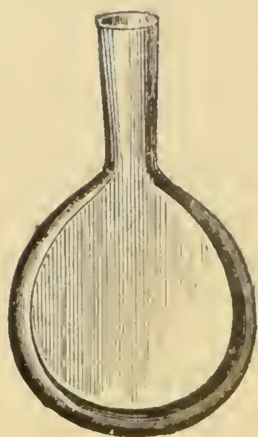


Fig. 132. — Fiole plate de Kolle.

Esmarch (1) a modifié le procédé primitif de Koch de la façon suivante. Il opère les dilutions dans des tubes un peu plus gros que les tubes à essai ordinaires, et, ce qui fait la particularité de cette *méthode d'Esmarch*, au lieu d'en verser le contenu au dehors sur les plaques, il le solidifie dans l'intérieur même du tube, en provoquant la coagulation en couche uniforme le long des parois. Il l'obtient facilement en maintenant le tube horizontalement sous un robinet d'eau froide et en lui imprimant un mouvement assez rapide de rotation entre les doigts. Des appareils assez compliqués ont été imaginés pour remplir cet office. On évite ainsi les contaminations diverses qui peuvent survenir dans le cours des opérations de la méthode des plaques ; il y a certitude absolue que les colonies développées dans ce manchon de gélatine proviennent bien toutes de la matière d'ensemencement. Mais il est plus difficile d'examiner fructueusement les colonies et, de plus, lorsqu'il se trouve dans le mélange des espèces liquéfiant la gélatine, le liquide produit coule plus vite et vient troubler l'expérience.



Fig. 133. — Fiole plate de Soyka.

En somme, la méthode de Koch, bien qu'elle exige une certaine habitude, des manipulations minutieuses et un outillage assez perfectionné, est

(1) Esmarch, Ueber eine Modification des Koch'sen Plattenverfahren (*Zeitschr. für Hygiene*, I, 2e p., p. 233, 1886).

encore, en prenant toutes les précautions nécessaires et en usant de boîtes de Petri, celle qui est à recommander, qui donne les résultats les plus complets et qui, pratiquement, est la plus simple et la plus facile à appliquer.

Les germes, dont on observe le développement dans les cultures sur plaques, peuvent ne pas provenir tous de la substance à examiner.

Un certain nombre d'entre eux ont été déposés par l'air, durant le cours de manipulations. Lorsqu'on prend soin de recouvrir chaque plaque d'une cloche pendant le refroidissement de la gélatine, et qu'on opère dans un milieu où l'air n'est pas agité, l'apport de germes par l'atmosphère peut être considéré comme rare ou au moins peu important. C'est ce qui résulte de nombreuses expériences, de celles de Miquel en particulier (1). Il en est de même pendant les premiers jours des cultures, où elles ne servent encore que très peu ou pas du tout et restent enfermées dans la chambre humide, si celle-ci a été soigneusement stérilisée. Mais, dès qu'on les manie souvent pour les examiner, la contamination se fait et parfois même dans une large proportion. Il est toutefois facile de distinguer les colonies de ces germes de l'air qui ne se trouvent qu'à la surface de la gélatine, tandis que les autres se trouvent aussi dans les parties profondes; de plus, avec un peu d'expérience, on appprend vite à connaître l'aspect des colonies des premiers. Il est du reste aisé de se rendre compte de la moyenne des contaminations, en exposant des plaques témoins à côté des véritables plaques de culture; on reconnaît alors que la contamination est loin de se faire dans d'aussi larges limites que le prétendent beaucoup d'observateurs, mais au contraire que c'est, la plupart du temps, lorsque toutes précautions sont prises, un facteur presque négligeable. On évite en majeure partie les impuretés de l'air en faisant les cultures en vases clos, en cristallisoirs couverts, en boîtes de Petri, en flacons d'Erlenmeyer, en fioles plates ou surtout en tubes d'après le procédé d'Esmarch, mais, dans ces derniers cas, on perd ainsi bien des avantages de la méthode.

L'apparition des colonies se fait plus ou moins tôt dans ces cultures, suivant les conditions de température et les espèces auxquelles on a affaire. D'habitude, on les remarque comme un piqueté blanc, surtout si la plaque se détache sur un fond noir, au bout de dix-huit à trente-six heures. A un faible grossissement, 25 à 55 diamètres, elles se distinguent comme autant de petites taches sphériques ou discoïdes blanches, grises, jaunâtres, opaques ou plus ou moins transparentes. Ce n'est souvent qu'après quelques jours qu'elles prennent un aspect véritablement caractéristique. Beaucoup ont alors gagné la surface de gélatine, où elles se sont épanouies. C'est du deuxième au cinquième jour que l'étude des plaques est particulièrement instructive. Si nous examinons, après une telle durée, une culture d'eau préparée comme il a été dit précédemment, nous y trouvons tout un ensemble de colonies dont la diversité d'aspect nous surprendra souvent (fig. 134 et 135). Les unes ne modifient pas l'aspect ni la constitution de la gelée nutritive; ce sont de petits disques plus ou moins étalés sur la surface libre, des portions

(1) Miquel, Les organismes vivants de l'atmosphère, Paris, 1882, et *Annuaire de Montsouris*, 1880-1891.

de sphère souvent irrégulières qui proéminent, de petites masses mamelonnées ou lobées envoyant parfois des expansions latérales longues et nombreuses. Les autres liquéfient tout autour d'elles la gélatine au fur et à mesure qu'elles s'étendent (fig. 134, *a*); cette liquéfaction peut se faire d'une façon régulière sur toute la périphérie de la colonie, ou bien ne s'opérer principalement ou exclusivement que dans certaines direc-

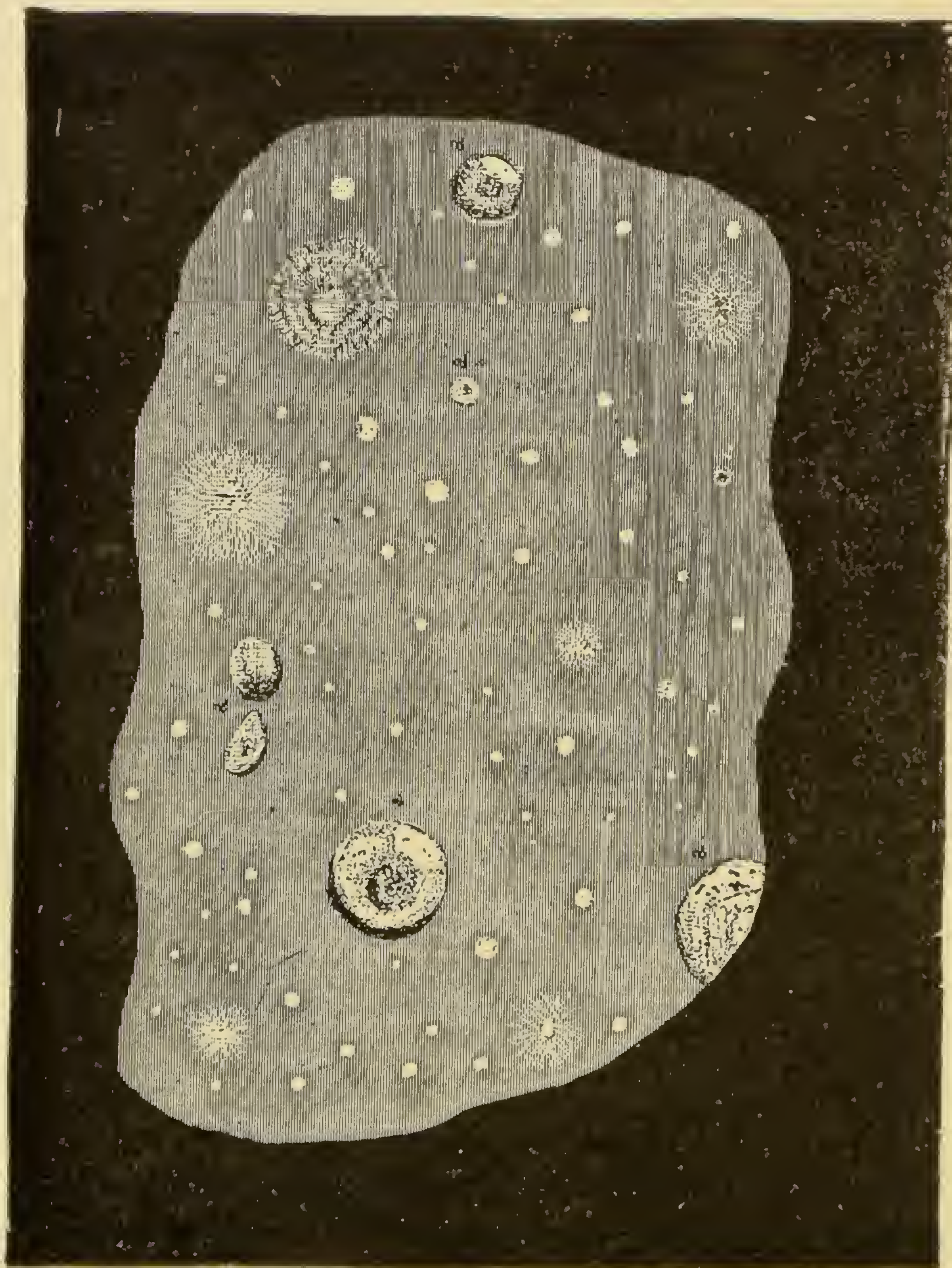


Fig. 134. — Aspect d'une culture sur plaques (grandeur naturelle).

tions. De la portion centrale de la Zooglée partent dans ce cas des rayons droits ou tortueux qui s'enfoncent dans la masse et dirigent les tractus de liquéfaction. De cette excessive variété des formes on tirera des caractères de premier ordre pour la diagnose des espèces auxquelles appartiennent les colonies obtenues. Souvent des espèces de l'air viennent émailler les plaques de leurs couleurs vives, rouge, rose, jaune, blanc éclatant. Enfin, dans les cultures âgées surtout, apparaissent de nombreuses Moisissures à tendance envahissante. Ce sont les flocons blancs du *Penicillium candidum*, les disques verts à cercles concentriques

des *Penicillium glaucum* et *Aspergillus glaucus*, les dômes d'un noir vert de l'*Aspergillus niger*, le duvet blanc de plusieurs *Mucor*. Tous sont des ennemis à craindre pour les cultures; ils arrêtent le développement des colonies en les étouffant dans un lacis serré de tubes mycéliens ou en liquéfiant rapidement la gélatine; aussi ne saurait-on trop se précautionner contre eux. On s'en défend par une stérilisation soignée des chambres humides où se placent les plaques et par la destruction à la chaleur de ces amas de Moisissures dont on doit empêcher le plus possible la dissémination des spores dans le local d'observation.

L'examen de ces colonies à un grossissement de 15-50 diamètres donnera de précieux renseignements sur leur aspect général, et, s'il y a lieu, sur les rapports de leurs différentes parties. Les objectifs 0 de Vérick et les différents systèmes *a* de Zeiss, et aussi les objectifs 0* et *a** à grossissement variable de ces mêmes constructeurs (Voy. p. 185) sont d'un très bon usage pour ces observations. Des combinaisons plus fortes, 2 de Vérick ou BB de Zeiss, révéleront souvent ou feront mieux voir certains détails de structure. Enfin, dans des cas spéciaux, il pourra être utile d'employer des objectifs de force moyenne, 4 de Vérick ou DD de Zeiss, lorsque la transparence des parties à examiner le permettra. L'emploi d'objectifs plus forts n'est pas possible à cause de leur trop court foyer et du peu de lumière dont on dispose généralement dans ces observations.



Fig. 135. — Aspect d'une culture sur plaques d'eau en boite de Petri.

Le dessin de ces figures si variées est un excellent moyen de se les rappeler. C'est ici surtout que la photomicrographie rend d'importants services pour rendre bien des détails que les dessins les plus soignés ne peuvent exactement représenter.

L'étude complète exige l'examen des éléments constituants à de forts grossissements. Une parcelle de la colonie dont on s'occupe est enlevée avec un fil de platine préalablement rougi dans la flamme et refroidi, puis dissociée sur un porte-objet dans une goutte d'eau pure ou de la solution d'acétate de potasse. La préparation est recouverte d'une lamelle et examinée aux combinaisons optiques voulues, à l'aide d'un fort objectif à sec d'abord et d'un objectif à immersion ensuite. La prise de substance avec l'aiguille de platine doit être faite de façon à ne tou-

cher qu'à la seule colonie que l'on vise. Il est souvent avantageux, parfois nécessaire, de s'aider d'un faible grossissement fourni par une loupe à dissection ou le microscope muni d'objectifs et d'oculaires faibles. Le renversement des images gêne au début, mais, avec un peu d'attention et d'habitude, il devient facile d'opérer dans ces conditions. Il va sans dire qu'on pourra faire usage des méthodes d'observation ordinaires, en particulier des procédés divers de coloration, pour arriver à un résultat le plus satisfaisant possible.

Avec des colonies obtenues sur plaques, bien isolées les unes des autres, il est très simple d'obtenir des cultures pures des espèces ensemencées. On procède à l'ensemencement sur gélatine ou sur gélose, en suivant les précautions énoncées précédemment au sujet des cultures en tubes. Il faut choisir, si faire se peut, une colonie bien isolée, dans laquelle un examen attentif au microscope ne décèle aucun mélange. On plonge dans la colonie l'extrémité de l'aiguille de platine préalablement stérilisée au feu. L'opération se fait, comme la précédente, à l'œil nu ou à un faible grossissement. L'opérateur tient de la main gauche un tube de culture dont il a libéré le bouchon d'ouate en le tordant sur lui-même de façon à pouvoir l'ôter sans encombre. En tenant le tube incliné, l'orifice tourné vers le bas ou au moins le plus horizontalement possible, il enlève la bourre de la main droite munie de l'aiguille de platine chargée de la matière prise à la colonie, puis plonge l'aiguille dans le tube et ensemence le milieu par une piqûre ou une strie. Pour les milieux liquides, on procède de même en agitant l'aiguille chargée de gélatine dans le liquide, de manière à y laisser des germes qu'elle porte. Il est bon, après coup, de vérifier au microscope l'état de la colonie touchée, pour s'assurer de la parfaite réussite de la manœuvre.

Quelle peut être la valeur de la forme des colonies en culture sur plaques? Si l'on était en droit d'admettre, toutes conditions égales d'ailleurs, la constance absolue de la forme pour une même espèce, on posséderait là un caractère d'une valeur exceptionnelle pour la détermination des espèces. Or, cette condition semble n'être pas toujours satisfaisante et souvent elle prête à d'assez larges variations. C'est ainsi qu'un *Bacille,* qui m'a paru bien voisin de l'espèce à laquelle Hauser a attribué le nom de *Proteus vulgaris*, ne m'a plus donné, après quatre ou cinq générations et un temps de culture assez long, les cultures sur plaques si caractéristiques, dont le centre émet en tous les sens de longs boudins tortueux, entremêlés les uns aux autres, mais bien de simples colonies à disposition radiée, n'émettant aucun de ces prolongements curieux. Certaines espèces possèdent la curieuse particularité de ne donner des colonies caractéristiques en cultures sur plaques que lorsqu'elles sortent d'un milieu naturel ; provenant d'autres cultures, par exemple, la forme change et est parfois bien différente de la première.

D'autres, au contraire, non seulement possèdent une forme en culture sur plaques absolument fixe et constante, mais reproduisent même cette forme identique lorsqu'on vient à les inoculer en piqûre sur un milieu à la gélatine. Il est possible que la forme de la culture sur plaques varie avec le temps, dans de certaines limites, en même temps que changent, nous l'avons vu, la vitalité de l'espèce et ses différentes manifestations physiologiques. Jusqu'ici, cependant, il paraît certain qu'en première

culture on peut se baser en toute assurance sur la forme de la colonie en culture sur plaques. En tenant compte de ce que nous savons des caractères des spores, il est probable aussi que la forme de la colonie est sensiblement constante quand elle provient d'une spore. La description exacte de la forme des colonies sur plaques des différentes espèces sera certainement d'une utilité très grande pour la diagnose des espèces, surtout pour celles que les dimensions ou les caractères ordinaires des cultures ne permettent pas de distinguer aisément.

La forme des colonies profondes diffère souvent de celle des colonies superficielles; la raison en est dans la résistance différente qu'offre le milieu à l'expansion de la colonie. D'habitude, c'est l'aspect des colonies superficielles qui est plus spécial, plus caractéristique. Il est donc nécessaire d'être précis sur ce point.

En été, pendant les fortes chaleurs, il est difficile, lorsqu'on ne possède pas de local suffisamment frais, d'obtenir, aussi facilement que d'ordinaire, des cultures sur plaques de gélatine, même en usant de gelée renfermant 12 p. 100 et plus de gélatine. Il faut user d'artifices pour maintenir les plaques à une température qui ne dépasse pas 20°. Deux moyens commodes peuvent être conseillés. On peut placer les plaques dans une boîte métallique recouverte en partie de feutre que l'on maintient mouillé en faisant baigner les bords dans l'eau ; l'évaporation abaisse souvent la température d'une manière suffisante. Ou bien, on peut les placer dans une petite étuve carrée ou quadrangulaire, à double paroi, en tôle de cuivre, dans laquelle on fait passer nuit et jour un courant d'eau fraîche. En usant de l'un ou de l'autre de ces procédés, on obtient aisément une température qui ne dépasse pas 18°.

Les cultures sur plaques avec les milieux à la gélatine ne doivent pas être exposées à une température supérieure à 20°-22°, sous peine de voir la masse fondre et perdre dès lors les précieux caractères qu'elle offrait. A peine peut-on songer, en mettant jusqu'à 15 p. 100 de gélatine, à atteindre 23°-24°. Aussi a-t-on cherché à mettre en pratique cette méthode avec des milieux moins fusibles, permettant d'employer une température supérieure, 35°-37°, et d'étudier ainsi des espèces qui ne croissent qu'à cette température. Le seul milieu que l'on puisse songer à utiliser est la gélose. Malheureusement, le produit n'est bien fluide qu'à une température de 40° au moins, bien élevée pour beaucoup de Bactéries. L'opération se conduit comme pour la préparation des plaques à la gélatine. La couche de gélose glissant facilement sur le verre, Esmarch (1) conseille d'ajouter quelques gouttes d'une solution de gomme arabique qui détermine l'adhérence. Les caractères des colonies développées sur plaques de gélose sont bien moins distinctifs qu'avec la gélatine ; il manque surtout l'indice souvent précieux de la liquéfaction. L'emploi de la gélose-gélatine (Voy. p. 249) n'est pas plus avantageux.

Unna (2) obtient des plaques au sérum en ajoutant au sérum préparé suivant son procédé (Voy. p. 260) 10 p. 100 de gélatine ou 6 p. 100 d'agar et en stérilisant à une température inférieure au point de coagulation.

(1) Esmarch, Ueber eine Modification des Koch'sen Plattenverfahren (*Zeitschr. für Hygiene*, I, 2e p., p. 293, 1886).

(2) Unna, Ueber eine neue Art estarten Blutserums und über Blutserumplatten (*Monatschr. für prakt. Dermat.*, V, 1886, n° 9).

La forme des colonies obtenues dans ces milieux diffère beaucoup de celles que les mêmes espèces donnent dans la gélatine, autant qu'on en peut juger maintenant.

Numération des colonies. — Pour que les colonies soient suffisamment espacées et puissent se distinguer assez nettement les unes des autres, surtout qu'on puisse en faire la *numération* exacte, il est nécessaire de recourir à une dilution suffisante. Avec les plaques de verre, la numération peut se faire en superposant la plaque à une feuille de papier blanc divisée en centimètres carrés par des traits noirs ou mieux à une ardoise

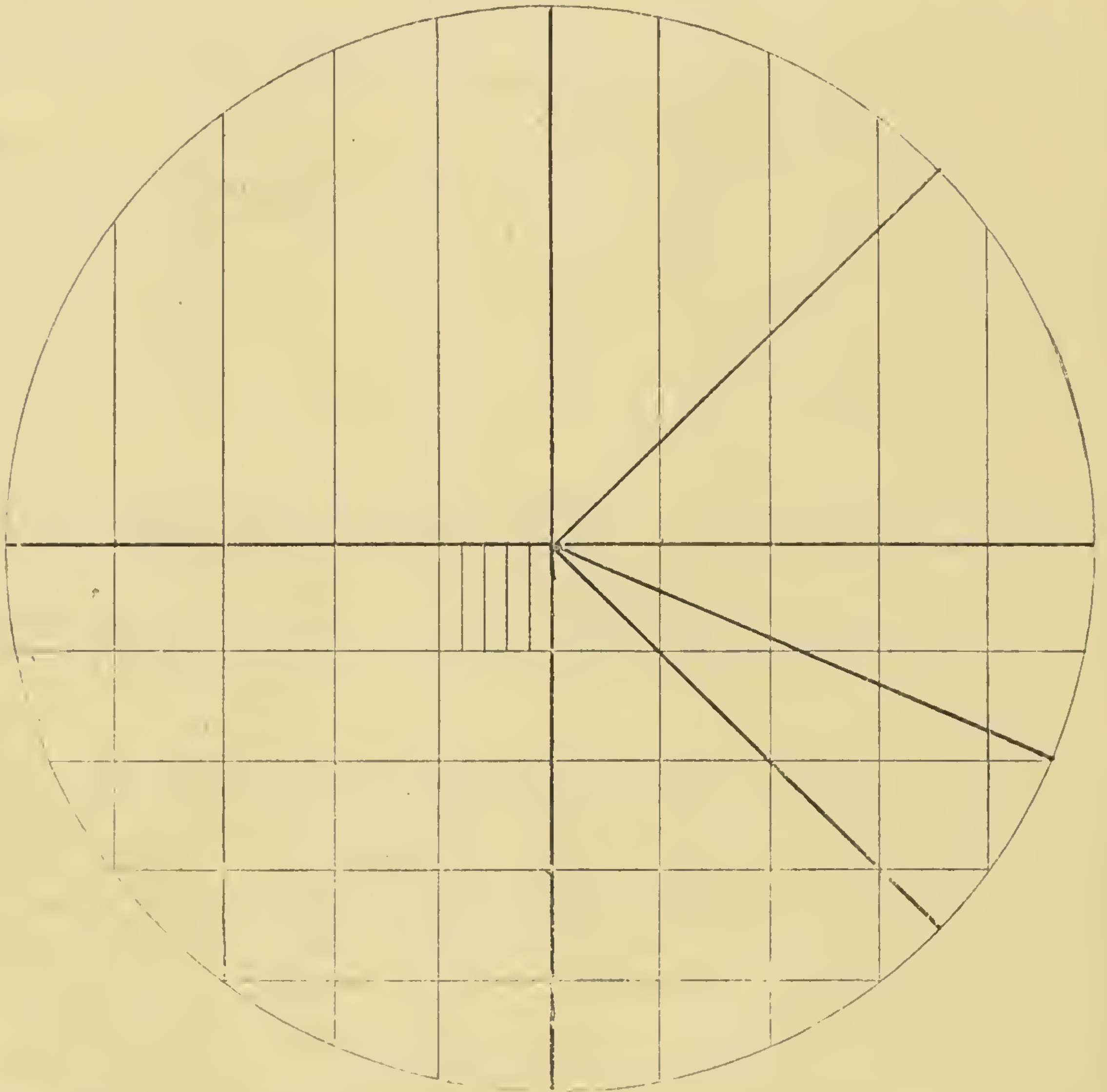


Fig. 136. — Dessin pouvant servir à la numération des colonies sur plaques.

portant pareille division en traits blancs ; ou bien, en retournant la plaque placée sur des cales assez hautes pour ne pas abîmer la couche de gelée, et marquant sur le verre les colonies par un point d'encre. Avec les boîtes de Petri, l'opération est plus facile ; on se sert des boîtes retournées, le fond portant la gelée mis en haut, placées sur un fond noir, et on compte les colonies en les marquant au fur et à mesure d'un point d'encre pour ne pas faire de double emploi.

Le nombre des colonies développées dans une culture sur plaque est souvent considérable ; il est alors difficile d'en faire une numération absolument complète, d'autant plus qu'il faut parfois opérer avec une loupe ou même sous le microscope. On se sert alors d'une lame de verre portant en son milieu, tracés à l'aide du diamant, quatre carrés de 1 cen-

timètre de côté qu'on superpose à la face postérieure du cristallisoir. On compte, en marquant de points d'encre, le nombre de colonies que renferme chacun de ces carrés, à la même place ou à des endroits divers et choisis comme représentant, en apparence, une bonne moyenne de colonies, on établit une moyenne à l'aide de laquelle le nombre total s'obtient avec une approximation suffisante.

L'emploi d'une figure comme celle représentée figure 136, tracée en blanc sur fond noir ou simplement établie sur ardoise, permet de faire aisément des numérations en différents sens. Son diamètre, de 10 centimètres, est celui des boîtes de Petri d'un usage courant. La numération peut se faire par quart de cercle, par centimètre carré, en établissant une moyenne et se servant du centimètre carré médian divisé en cinq parties, lorsque les colonies sont nombreuses et assez difficiles à compter ; par huitième ou par seizième de cercle, lorsque la répartition des colonies paraît être inégale dans une direction rayonnante, ce qui arrive quand le milieu de culture n'a pas partout une même épaisseur.

Lorsqu'on a obtenu une moyenne par centimètre carré, il est facile, avec la formule πR^2, d'avoir la surface totale de la culture et d'obtenir le chiffre total.

3. CULTURES DES ANAÉROBIES

Les espèces anaérobies ne pouvant, dans les conditions ordinaires, se développer en présence d'oxygène libre, il faut, pour les étudier, modifier les procédés habituels.

Le but cherché est la disparition de l'oxygène. Suivant le cas, cette absence d'oxygène doit être totale: il est des espèces qui l'exigent ; elle peut n'être que partielle : beaucoup d'anaérobies supportent la présence de petites quantités de ce gaz ; pour Fermi et Bassi (1), une petite proportion d'oxygène serait même toujours nécessaire.

On peut réussir en mettant en œuvre différents moyens. L'emploi du vide donne d'excellents résultats. Il en est de même des cultures faites dans une atmosphère de gaz inerte. Il est également possible, après avoir chassé tout gaz du milieu, d'empêcher plus ou moins tout nouveau contact avec l'air. Enfin, l'oxygène présent peut être éliminé en provoquant son absorption par des produits qui en sont avides ou par des microbes aérobies.

Les différentes méthodes employées se classent dans les quatre catégories suivantes :

1° Emploi du vide obtenu par la machine pneumatique, la pompe à mercure ou la trompe à eau ;

2° Privation d'oxygène par passage prolongé d'un gaz inerte dans le milieu ;

3° Privation d'oxygène par ébullition du milieu et refroidissement à l'abri de l'air, sous une couverture protectrice ou en présence d'un gaz inerte ;

4° Absorption de l'oxygène par des substances chimiques ou des microbes aérobies.

On obtient souvent les meilleurs résultats en combinant les effets de deux ou plusieurs de ces procédés, employant à la fois le vide et la pré-

(1) Fermi et Bassi. Ref. in *Revue générale de path. interne*, III, 1900, n° 16, p. 392

sence d'un gaz inerte, et même l'addition d'une substance absorbant l'oxygène.

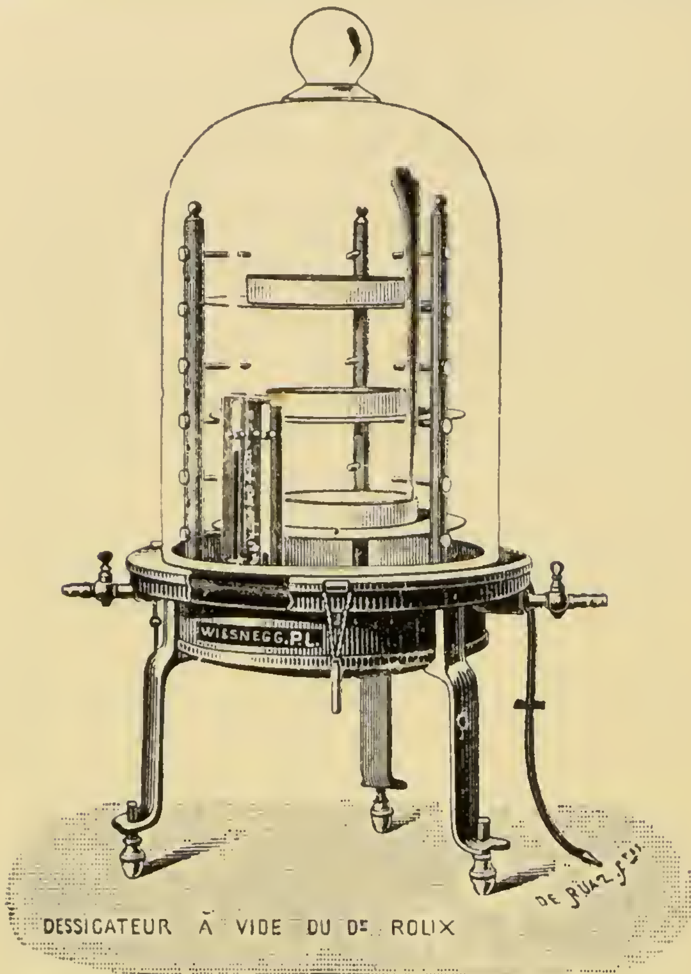


Fig. 137. — Cloche pour cultures et évaporations dans le vide.

1° *Méthodes basées sur l'emploi du vide.* — L'emploi du vide, très pratique, rend certainement d'excellents services dans les laboratoires. Il permet surtout de recueillir, à l'état de pureté, les gaz produits par le développement du microbe. La plupart des milieux renfermant de l'eau, l'air retiré est naturellement remplacé par de la vapeur d'eau en proportion plus ou moins grande.

Pour obtenir le vide, on peut se servir d'une machine pneumatique quelconque, ou mieux d'une pompe à mercure, ou des trompes à eau, qui donnent, il est vrai, un vide moins parfait que les appareils précédents, mais sont d'une installation et d'un maniement beaucoup plus commodes. Avec quelques dispositions de robinets, faciles à combiner, il est possible, le vide fait, de laisser pénétrer un gaz inerte, de l'hydrogène par exemple. Zupnik (1) conseille l'emploi du vide barométrique, facile à obtenir à l'aide de dispositifs assez simples.

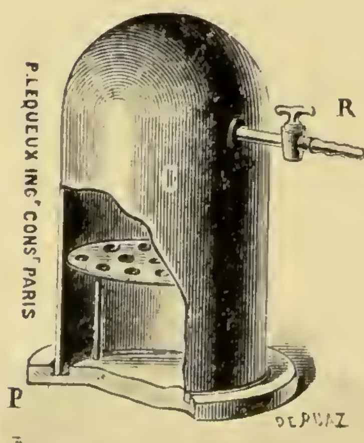


Fig. 138. — Cloche à vide du Dr L. Martin.

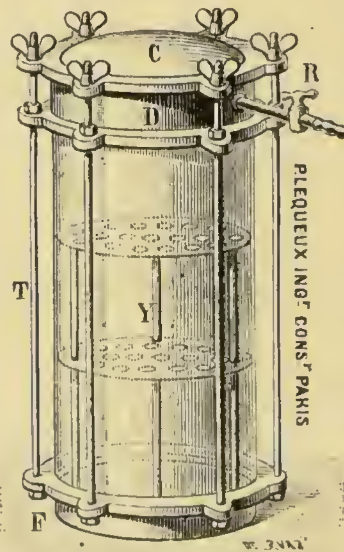


Fig. 139. — Étuve à vide à paroi de verre.

Le vide peut être fait dans des tubes ou ballons étirés préalablement en un ou plusieurs endroits et garnis de milieu de culture ensemencé. L'obturation s'obtient en fondant au chalumeau la partie étirée. Un simple tube à essai ou un ballon, fermés par un bon bouchon de caoutchouc traversé par un tube de verre que l'on étire après l'opération, peuvent donner de très bons résultats.

(1) Zupnik, Ueber eine neue Method anaërober Züchtung (*Centralbl. für Bakt.*, XXIV, 1898, p. 267).

Les appareils représentés figures 137, 138 et 139 servent à placer des cultures que l'on veut faire dans le vide ou dans un gaz inerte. Il est facile de saisir leur mode d'emploi.

Ou bien, on peut se servir de l'appareil représenté figure 140, permettant de faire des cultures dans le vide de la même façon que les cultures ordinaires. De tels appareils permettent également l'introduction d'un gaz inerte quelconque.

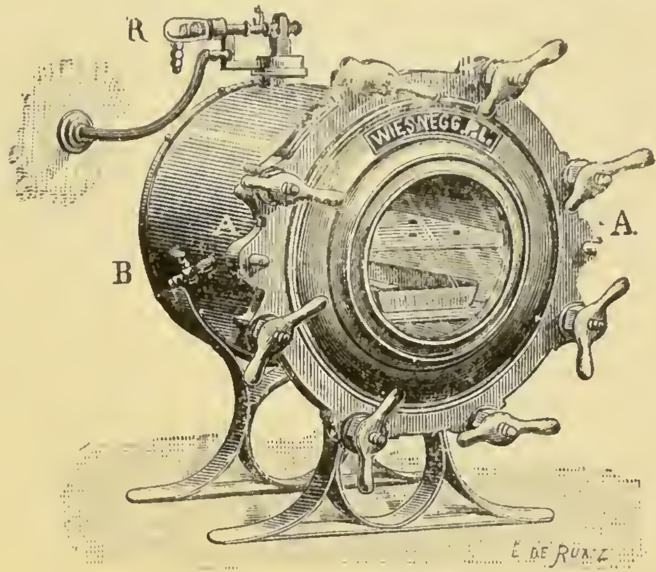


Fig. 140. — Appareil pour cultures dans le vide.

Les petits appareils représentés figures 141, 142 et 143, imaginés par Novy, permettent aussi de faire dans le vide ou dans un gaz inerte des cultures en vases de différentes formes. Leur fonctionnement est facile à comprendre : une des tubulures est reliée à la machine à faire le vide, le bouchon-robinet permet de faire entrer un gaz inerte. Les appareils des figures 141 et 142 sont formés de parties qui se réunissent hermétiquement au moyen d'un anneau de caoutchouc.



Fig. 141.

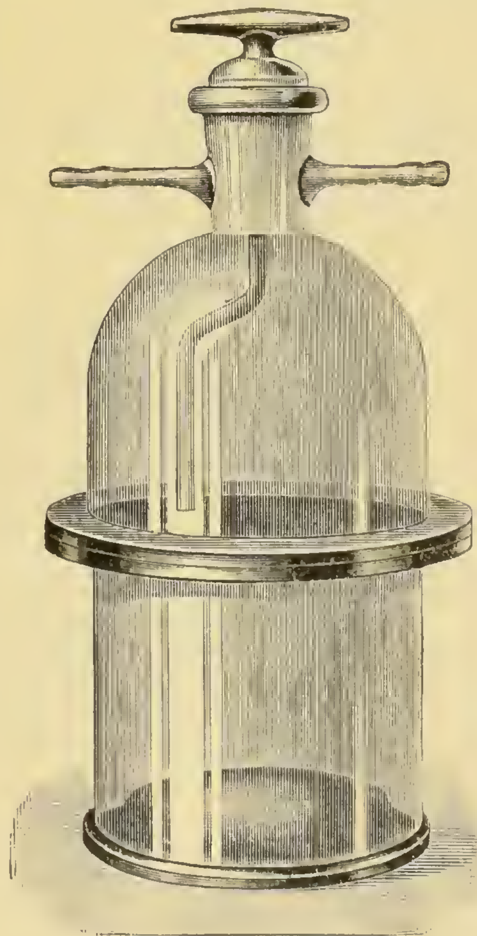


Fig. 142.

Appareils de Novy pour cultures d'anaérobies.

L'appareil d'Arens (fig. 144) permet de faire des cultures d'anaérobies comme on fait des cultures d'aérobies en boîtes de Petri. Son fonction-

nement se conçoit à la seule inspection de la figure ; on le remplit d'un gaz inerte et l'on ferme les tubes aux effilures.

L'appareil de Baginsky (fig. 145) fonctionne de la même façon et permet de disposer d'un plus grand espace.

Roux (1), dans un travail à consulter, a exposé les méthodes suivies au laboratoire de Pasteur pour cultiver les anaérobies. Pour les cultures dans les liquides, il recommande l'appareil représenté figure 146. C'est un tube à

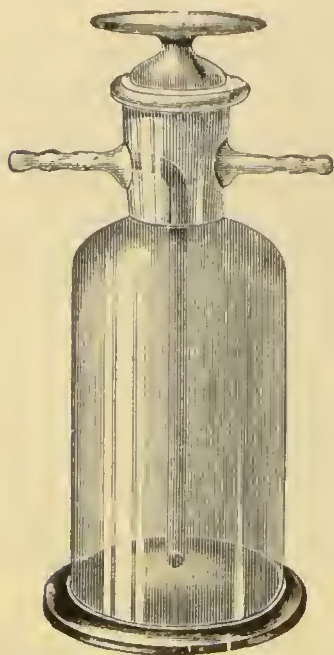


Fig. 143. — Appareil de Novy pour cultures d'anaérobies.



Fig. 144. — Boîte d'Arens pour anaérobies.

deux branches de Pasteur, étranglé en A et muni, au-dessous de l'étranglement, d'un tampon de coton. Chaque branche est munie d'une effilure latérale. Le tube est stérilisé dans le four à flamber. A l'aide des effilures latérales, que l'on ferme aussitôt à la flamme, on introduit dans une branche du liquide nutritif ensemencé et dans l'autre du liquide pur. On fait le vide plusieurs fois de suite en reliant à une trompe T un des deux robinets supérieurs. On peut faire pénétrer un gaz inerte par le second robinet ou maintenir le vide. Le tube est fondu en A et mis à l'étuve. Pour obtenir une seconde culture, il suffit, en inclinant le tube, de faire passer une petite quantité du liquide où se développe la Bactérie dans la seconde branche. Si l'on désire examiner le liquide, on relie l'extrémité du tube A au gazomètre G et l'on casse sa pointe dans le tube de caoutchouc intermédiaire ; en brisant l'extrémité d'une effilure latérale, on fait couler la quantité voulue. La culture

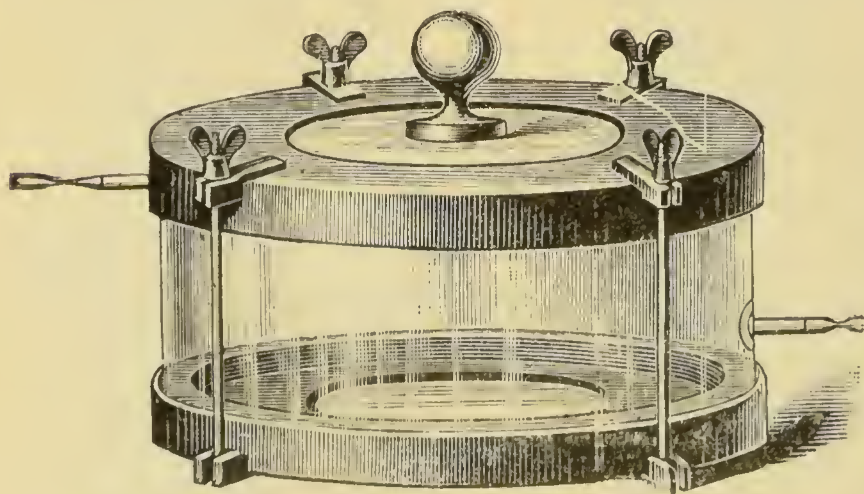


Fig. 145. — Appareil de Baginsky pour anaérobies.

(1) Roux, Sur la culture des microbes anaérobies (*Ann. de l'Inst. Pasteur*, I, 1887, p. 49).

se continue très bien si l'on referme les deux tubes ouverts sans introduction d'air.

Pour les milieux solides, Roux emploie, entre autres, le tube figuré ci-dessous (fig. 147). La technique est la même que précédemment. L'ensemencement de la gélatine se fait par la tubulure *a* qui est brisée, puis refermée aussitôt. On fond la seconde branche en *b* lorsque le tube ensemencé est vide d'air ou rempli de gaz inerte. En répartissant les germes dans la masse et en couchant le tube, on obtient une sorte de culture sur plaques. Pour atteindre les colonies, on fait sur le tube un trait à la lime sur lequel on applique un charbon rougi ; les deux parties se détachent aussitôt. On trouvera, d'ailleurs, d'intéressants détails dans l'excellent mémoire cité.

Pour obtenir de grandes quantités de cultures en bouillon, on peut user très avantageusement de flacons de 1 litre et plus fermés par un

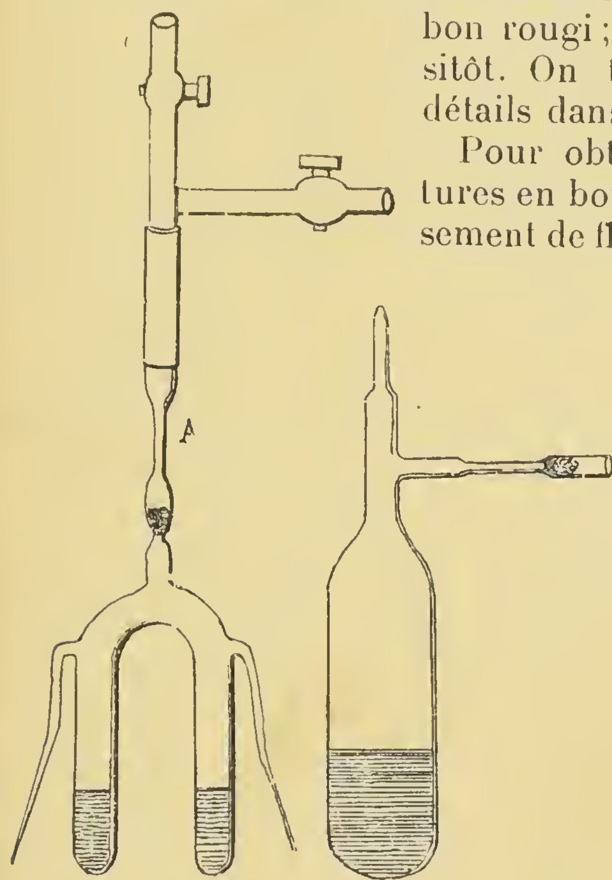


Fig. 146. — Appareil de Roux pour la culture des anaérobies.

Fig. 147. — Tube de Roux.

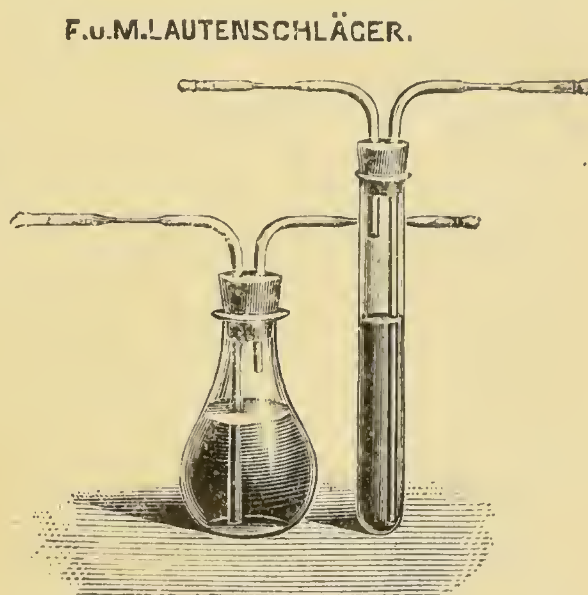


Fig. 148. — Appareils pour cultures d'anaérobies.

bon bouchon de caoutchouc percé de deux trous dans lesquels passent deux tubes de verre disposés comme ceux d'une pissette de laboratoire. Le tube qui doit plonger dans le liquide est effilé et fermé à son extrémité libre, l'autre porte un ou deux étranglements sur sa branche libre et est obturé par un tampon d'ouate. Le flacon est rempli de bouillon aux deux tiers et le tout est stérilisé à l'autoclave à 120°. Lorsque le flacon est suffisamment refroidi, on brise l'extrémité effilée du tube et l'on aspire quelques gouttes de la solution à ensemencer, on referme ce tube au feu. On fait ensuite dans l'appareil le vide aussi complet que possible avec une bonne trompe. On fait à une ou deux reprises passer de l'hydrogène dans le flacon et l'on ferme en fondant un des étranglements du second tube. On opère de même en petit avec des appareils tels que ceux de la figure 148 ; en employant un gaz inerte, au lieu de fermer les tubes d'entrée et de sortie à la lampe, on peut se contenter de placer une forte pince à pression sur un tuyau de caoutchouc serrant bien ces tubes.

Nous avons vu précédemment (p. 278) la modification proposée par Roux pour obtenir des cultures sur pommes de terre à l'abri de l'oxygène.

2° *Méthodes basées sur la privation d'air par un courant de gaz inerte.* — Pasteur (1), dans ses recherches sur la *vie sans air*, ensemençait les espèces qu'il étudiait, et tout particulièrement le *Bacillus butyricus*, dans des liquides privés d'air, en y faisant barboter, pendant un temps assez prolongé, un courant d'hydrogène et d'acide carbonique. C'est encore un des moyens les plus simples auxquels on puisse avoir recours, en variant le dispositif de l'appareil suivant les besoins. Le vase, ballon ou tube de verre contenant le bouillon de culture ou la gelée maintenue liquide au bain-marie, est muni d'un bouchon de caoutchouc traversé par deux tubes de verre munis de robinets. Le tube d'arrivée du gaz plonge jusqu'au fond du milieu nutritif, l'autre dépasse à peine le bouchon. Le gaz inerte barbote dans le liquide et lui enlève peu à peu l'oxygène qu'il contient en s'y substituant ; il arrive même à constituer en entier l'atmosphère de l'appareil. L'ensemencement se fait à une température qui ne doit pas être supérieure à 40° ; après avoir fait passer le gaz inerte pendant un certain temps, le courant gazeux doit être continué après pour enlever l'air apporté par cette opération.

On ferme les deux robinets, ou l'on met l'extrémité du tube de dégagement sous le mercure d'une cuve, ce qui permet de recueillir facilement les produits gazeux qui peuvent se dégager. Lorsqu'on possède une trompe à mercure ou à eau, ou tout autre appareil à faire le vide, il est bien plus facile d'enlever toute trace d'air en faisant le vide plusieurs fois de suite dans l'appareil et y laissant rentrer chaque fois du gaz inerte. Les gaz employés peuvent être l'azote, l'hydrogène ou l'acide carbonique. Ce dernier est plutôt à rejeter, car il exerce une action toxique sur plusieurs Bactéries. L'azote est relativement difficile à préparer. C'est l'hydrogène qu'il est le plus facile de se procurer, surtout à l'aide d'un appareil à production continue, très simple à monter et d'un usage courant dans tous les laboratoires de chimie ; il doit être pur, être dépourvu surtout d'hydrogène sulfuré et d'oxygène ; on le dépouille du premier gaz en le faisant barboter dans une solution d'acétate de plomb et du second en le faisant traverser un flacon contenant une solution alcaline d'acide pyrogallique. Ferran (2) conseille l'acétylène, si facile à obtenir à l'aide du carbure de calcium et de l'eau. D'après Kladakis (3), le gaz d'éclairage n'est pas à employer ; il est nuisible à beaucoup de Bactéries ; il réussit cependant dans bien des cas et évite alors une préparation spéciale. Lorsque les gaz provenant du développement des Bactéries anaérobies doivent être analysés, l'emploi de l'hydrogène ou de l'acide carbonique doit être évité ; ces deux gaz se retrouvent en effet toujours dans les produits des fermentations occasionnées par ces êtres ; il deviendrait délicat ou impossible de séparer le gaz dégagé du premier. On peut alors se servir d'azote ou, mieux, faire simplement la culture dans le vide obtenu avec la trompe.

(1) Pasteur, Animalcules infusoires vivant sans gaz oxygène libre (*C. R. de l'Acad. des sc.*, LII, 1861, p. 344), et Études sur la bière. Paris, 1876, p. 282.

(2) Ferran, Ueber die Verwendung des Acetylens bei der Kultur anaërober Bakterien (*Centralbl. für Bakt.*, XXIV, 1898, p. 29).

(3) Kladakis, Ueber die Einwirkung des Leuchtgases auf die Lebensthätigkeit der Mikroorganismen. Berlin, 1890.

Il est difficile de purger complètement d'oxygène un milieu de culture, surtout s'il est visqueux comme les gelées fondues. Heureusement, beaucoup d'anaérobies supportent très bien la présence de petites quantités d'oxygène; aussi leurs cultures s'obtiennent aisément. D'autres, au contraire, ne peuvent se développer qu'en l'absence absolue de ce gaz; ceux-là exigent une attention spéciale pour l'enlever totalement du milieu.

3° *Méthodes basées sur la privation d'oxygène par l'ébullition du milieu suivie de refroidissement à l'abri de l'air.* — On peut se servir de pipettes semblables à celles représentées figure 160, p. 318, dans lesquelles on introduit par aspiration, jusqu'en haut, du bouillon soumis quelques instants à l'ébullition; on ferme l'extrémité inférieure à la lampe, on ensemence aussitôt que le refroidissement est suffisant, puis on ferme au chalumeau au-dessus de la bourre d'ouate. Après développement on peut faire une prise en ouvrant à la lampe une des extrémités effilées, avec précaution, pour donner issue aux gaz qui se développent souvent dans ces cultures et font une légère pression, puis en coupant le tube avec un trait de lime et une goutte de verre fondue au rouge vif.

Ou bien on fait bouillir quelques instants du bouillon contenu dans un tube à essai et l'on verse de suite à sa surface une couche de quelques centimètres d'huile ou de vaseline liquide stérilisées. Après refroidissement, on ensemence dans le bouillon avec du liquide contenu dans une pipette de verre très effilée, en ayant soin de ne pas en chasser tout le liquide pour éviter le contact de l'air de la pipette avec le milieu. La petite quantité d'oxygène qui peut être apportée par l'opération est rapidement fixée par le milieu lui-même. Kasparek (1) propose une petite modification qui peut rendre service. Il conseille l'emploi de ballons de forme quelconque, qui portent près du col une petite ampoule reliée par un court tube de faible diamètre, dans laquelle peut se collecter, par une simple inclinaison, la majeure partie de la couche protectrice d'huile ou de vaseline; il est alors beaucoup plus facile de faire des prises du milieu pour l'étude après développement.

Procédé recommandé. — Rosenthal (2) remplit des tubes de bouillon, lait ou tout autre liquide, à la façon ordinaire, puis verse à la surface une légère quantité de lanoline fondue sur une hauteur d'un demi-centimètre environ; il stérilise à l'autoclave, un quart d'heure à 120°. Après refroidissement, le liquide est emprisonné par le revêtement solide de lanoline, qui empêche tout contact avec l'air. C'est ce qu'il appelle un *tube cacheté*. Pour l'ensemencer, la couche de lanoline est fondue par une légère exposition à une flamme de gaz (la lanoline fond vers 42°); la matière d'ensemencement est introduite avec une pipette effilée ou un fil de platine stérilisés. En utilisant des ballons remplis de liquide jusque dans la partie inférieure du col et en y mettant une couche de lanoline, il obtient le *ballon cacheté*. Tubes et ballons cachetés, bien préparés, peuvent se conserver un ou deux mois prêts à

(1) KASPAREK, Ein einfach Luftabschluss flussiger Nährboden beim kultivieren anaërober Bakterien (*Centralbl. für Bakt.*, XX, 1896, p. 536).

(2) ROSENTHAL, Procédé extemporané de culture des microbes anaérobies en milieu liquide : les tubes cachetés (*Soc. de Biol.*, 18 octobre 1902). — L'aérobisation des microbes anaérobies. Paris, Alcan, 1908.

servir ; après un plus long temps, il est prudent de les remettre une dizaine de minutes à 110° avant de les utiliser.

Pour étudier le contenu après développement, on fond de même la couche de lanoline, on fait pénétrer une pipette dans le milieu et on en prélève aisément la quantité voulue. Par refroidissement, le tube cacheté se reconstitue sans qu'il y ait eu pénétration d'air.

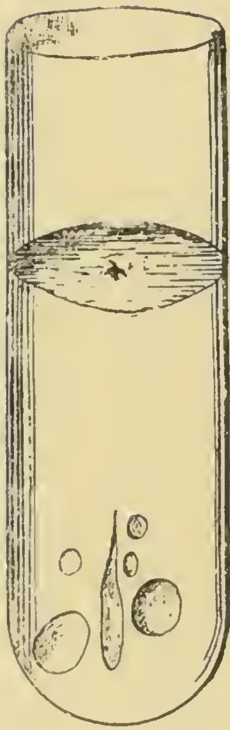


Fig. 149. — Culture du *Vibrion septique* dans les couches profondes d'un tube de gélatine glucosée.



Fig. 150. — Culture du *Bacille du tétanos* sur gélatine glucosée inoculée en piqûre profonde (d'après Kitasato).



Fig. 151. — Culture du *Bacille du tétanos* sur gélatine glucosée, après répartition dans le milieu de la matière d'ensemencement (d'après Fraenkel et Pfeiffer).

On peut se servir de la même manière de faire pour des cultures dans la gélose ou la gélatine en employant ou bien des tubes de faible diamètre que l'on remplit du milieu préalablement bouilli et maintenu liquide pour l'introduction, ou des tubes à essai contenant une couche assez haute de gelée liquéfiée que l'on recouvre aussi d'huile ou de vaseline liquide stérilisées. La modification indiquée par Vignal (1) est assez pratique La gélatine d'un tube à essai bouillie, puis refroidie en présence d'hydrogène, ou d'une petite couche d'huile stérilisée, est ense-

(1) Vignal, Sur un moyen d'isolation et de culture des microbes anaérobies (*Ann. de l'Inst. Pasteur*, *I*, 1887, p. 318).

mencée vers 25°, puis agitée avec précaution pour bien répartir les germes dans la masse. Par aspiration, on en remplit un tube de verre stérilisé au feu, de 3 à 4 millimètres de diamètre et de 1 mètre environ de longueur, dont l'extrémité qui plonge dans le liquide a été étirée, tandis que l'autre est bouchée par un tampon de coton. L'opération faite sans aucune aspiration d'air, les deux extrémités sont fondues à la



Fig. 152. — Culture du *Vibrion septique* dans la gélose glucosée, en couches profondes (d'après Liborius).



Fig. 153. — Culture du *Vibrion septique* dans la gélose glucosée, en couches profondes, après vingt-quatre heures à 37° (d'après Fraenkel et Pfeiffer).



Fig. 154. — Culture du *Vibrion septique* dans la gélatine glucosée, après répartition dans le milieu de la matière d'ensemencement (d'après Fraenkel et Pfeiffer).

flamme et fermées. Les anaérobies se développent dans la gelée et donnent des colonies qui sont isolées les unes des autres, si la dilution a été suffisante. On arrive facilement à ces colonies en coupant le tube au niveau voulu ; les fragments du tube peuvent encore être conservés en plongeant leur extrémité ouverte dans de la cire fondue. Il est toujours bon, avant de casser le tube à l'endroit voulu, d'ouvrir au feu la pointe terminale, pour donner issue aux gaz formés, qui pourraient projeter le contenu au dehors ; cette extrémité est refermée aussitôt.

La gélatine peut servir aussi bien que la gélose, mais elle se liquéfie

R. Würtz et Foureur (1) disent avoir obtenu de très bons résultats de l'emploi de l'ébullition, puis du gaz d'éclairage pour la culture de certaines espèces anaérobies types, entre autres le *Vibrion septique*, le *Bacille du charbon symptomatique* et le *Vibrion butyrique*. Leur procédé est très simple et mérite d'être employé; il permet d'obtenir de grandes quantités de cultures. Ils enlèvent d'abord l'oxygène que contient le milieu nutritif en faisant bouillir ce dernier, bouillon, gélatine ou gélose, en présence du gaz d'éclairage. Leur dispositif est très pratique ; il suffit de brancher le tube d'arrivée du gaz au col d'un matras et d'adapter, sur une tubulure latérale soudée à la base de ce col, un second tube de caoutchouc se rendant au brûleur de Bunsen. On peut aussi adopter un dispositif plus simple, semblable à celui de la figure 148. Le gaz arrive à la surface du milieu nutritif avant de brûler. On fait passer le courant de gaz pendant quelques secondes avant d'allumer le brûleur, afin d'éviter la formation d'un mélange détonant. Une ébullition de quelques minutes suffit. Le milieu est ensuite réparti par la tubulure latérale dans des tubes à essai où l'on a chassé l'air par un courant de gaz. Lorsque la quantité de milieu est suffisante, tout en laissant arriver encore le gaz par un tube de verre plongeant jusqu'au fond du vase, on verse à la surface quelques centimètres cubes de pétrole ou d'huile stérilisés. Les tubes sont stérilisés à l'autoclave. Pour ensemencer, on fait arriver à nouveau du gaz dans le tube, on incline celui-ci de manière à découvrir le milieu et l'on inocule avec le fil de platine. Il est possible, en opérant ainsi, d'obtenir des cultures sur plaques de gélatine d'espèces anaérobies en disposant les plaques sous une cloche bien suiffée, à ses bords, traversée par un courant de gaz d'éclairage, telle que celle représentée figure 137 ou toute autre analogue.

4° *Méthodes basées sur l'absorption de l'oxygène par des substances chimiques.* — On arrive très commodément à de bons résultats en ajoutant préalablement aux gelées nutritives bouillies d'avance et maintenues fondues différentes substances facilement oxydables qui absorbent assez vite les traces d'oxygène que le milieu peut encore contenir ou celles qui peuvent y revenir par diffusion. Kitasato et Weil (2) recommandent à ce point de vue le *formiate de soude*, que l'on ajoute à la gélose ou à la gélatine en proportion de 0,3 à 0,5 p. 100; Salomonsen (3) indique le *sulfo-indigotate de soude* en proportion de 0,1 p. 100. Liborius (4) conseille avec ce dernier corps d'ajouter 2 p. 100 de *glucose* favorable au développement de beaucoup d'espèces et contribuant aussi à absorber de l'oxygène lorsqu'il est en milieu alcalin comme dans l'espèce (5). Après ensemencement, il est bon de verser dans le tube un peu de vaseline liquide ou d'huile stérilisées ; cette couche de 1 à 2 centimètres préserve les couches superficielles du milieu de la diffusion de

(1) R. Würtz et Foureur, Sur un procédé facile de culture des microorganismes anaérobies (*Arch. de méd. expér.*, I, 1889, p. 523).

(2) Kitasato et Weil, Zur Kenntniss der Anaeroben (*Zeitschr. für Hygiene*, VIII, 1890).

(3) Salomonsen, Bacteriological Technology, 1889.

(4) Liborius, *Zeitschr. für Hygiene*, I, 1886.

(5) Smith, Ueber die Bedeutung des Zuckers in Kulturmedien für Bakterien (*Centralbl. für Bakt.*, XVIII, 1895, p. 1).

l'oxygène de l'air. Il faut aussi chercher à ensemencer aussi profondément que possible, les couches inférieures étant toujours plus à l'abri de l'oxygène. Le développement microbien fait souvent pâlir la couleur bleue de la gelée au sulfo-indigotate, puis la décolore complètement, l'indigo bleu passant par réduction à l'état d'indigo blanc. Ces gelées ne doivent pas être préparées longtemps d'avance, la réduction se faisant lentement à la température ordinaire.

En somme, cette méthode de Liborius est basée sur l'élimination de l'oxygène par l'ébullition préalable, puis l'addition de substances absorbantes, et l'emploi des milieux solides en couches profondes. Elle a été perfectionnée et étendue par Veillon (1) qui en a fait un procédé courant très commode pour la culture ou pour l'isolement des anaérobies.

Procédé recommandé. — Veillon emploie la gélose nutritive glucosée à 1,5 p. 100 ; la gélatine réussit d'ordinaire moins bien ; le lactose donne de moins beaux développements que le glucose. La gelée est fondue, puis répartie dans des tubes de 1cm,5 à 2 centimètres de largeur et 20 à 25 centimètres de longueur, sur une hauteur de 12 à 15 centimètres. Les tubes, bouchés à la ouate, sont mis pendant vingt minutes à l'autoclave à 110°, puis sortis et aussitôt rapidement refroidis à 40°. On prend de la matière à ensemencer, soit avec un fil de platine, soit, mieux, lorsqu'elle est liquide, avec une pipette de verre longue et mince, bien stérilisée d'avance; la quantité à prendre peut varier suivant la richesse de la matière en microbes, ce que révèle un examen microscopique préalable. La matière est déposée en plein milieu. On agite pour bien répartir dans la masse. Avec une ou plusieurs gouttes de ce premier tube, on fait une seconde dilution dans un un tube n° 2, et avec autant de ce dernier, s'il est besoin, une troisième dilution; et ainsi de suite pour des dilutions plus élevées, si le produit est très riche en microbes. Il va sans dire qu'on peut aussi diluer d'emblée ce produit avec un liquide stérilisé et ensemencer directement ces dilutions. Les tubes ensemencés sont aussitôt plongés dans l'eau froide pour une solidification rapide, puis mis à l'étuve vers 37°. Il faut les examiner attentivement tous les jours; les colonies mettent souvent une semaine pour apparaître. Si les dilutions sont suffisamment poussées, les colonies qui apparaissent en temps voulu sont bien séparées les unes des autres; les figures 149 à 154 représentent des cultures de plusieurs microbes anaérobies faites dans ces conditions.

Pour les isoler, les reporter en nouvelles cultures et en faire l'examen microscopique, on peut se servir avantageusement d'une pipette longuement étirée, dont on brise la pointe avec une pince flambée, que l'on plonge dans la gelée jusqu'à la rencontre de la colonie. Par une légère aspiration, on fait entrer cette dernière dans la pipette, en totalité ou en partie ; l'opération se fait au mieux en munissant la grosse extrémité de la pipette d'un tube de caoutchouc un peu résistant de 30 à 40 centimètres de long pour faciliter le maniement, comme le recommande Guillemot (2). Avec le produit ainsi prélevé, on ensemence plusieurs

(1) Veillon, Les microbes anaérobies en pathologie (*Congrès intern. de méd.*, Paris, 1900). — Veillon et Zuber, Recherches sur quelques microbes strictement anaérobies et leur rôle en pathologie (*Arch. de méd. expér.*, juillet 1898).

(2) Guillemot, Recherches sur la gangrène pulmonaire. Thèse de Paris, 1898.

nouveaux tubes de gélose dans la profondeur ; la masse aspirée peut être expulsée dans une boîte de Petri stérilisée où se font alors des prélèvements secondaires. On observe souvent un développement de colonies dans toute la hauteur de la gélose. A la partie supérieure, ce sont des aérobies qui existaient dans le mélange ; à partir de 3 à 4 centimètres de profondeur, jusqu'en bas, ce sont exclusivement des anaérobies. Lorsqu'il est difficile d'aller ainsi chercher des colonies de la partie inférieure du tube, on peut, par un trait de lime et une perle de verre au rouge vif ou du charbon Berzélius, séparer la partie inférieure du tube et faire plus aisément le prélèvement.

Il est malheureusement fréquent de voir les gaz, que développent souvent les anaérobies, faire éclater la gélose, la disloquer en maints endroits, en expulser même du tube; l'air rentre alors souvent en abondance et vient arrêter le développement.

On peut obtenir des cultures en bouillon glucosé recouvert d'une couche de vaseline liquide stérilisée ; le milieu est soumis à une ébullition de quelques minutes ou placé à l'autoclave comme la gélose, refroidi vers 35°, ensemencé et mis à l'étuve. Il en est de même pour le lait ou d'autres milieux liquides, seuls ou additionnés de produits solides divers, pomme de terre, papier, blanc d'œuf cuit, viande, etc. Cette *méthode de Veillon* est certainement celle qui donne les meilleurs résultats et est spécialement à recommander pour l'étude des anaérobies. Il y a cependant une objection à faire dans l'emploi des milieux sucrés ; beaucoup d'anaérobies produisent aux dépens des sucres des acides qui peuvent, à un moment donné, entraver le développement ou gêner la production des produits diastasiques ou toxiques ; il est bon de s'en souvenir.

Büchner(1) a mis très heureusement à profit, pour cultiver les anaérobies, la propriété que possède le mélange d'acide pyrogallique et de potasse d'absorber rapidement une forte proportion d'oxygène. A froid, vers zéro degré, cette absorption est très lente ; à 20°, elle se fait bien. La solution est versée dans une enceinte bien bouchée dans laquelle se place le vase contenant le milieu de culture, fermé par un tampon d'ouate assez lâche, sans qu'il puisse y avoir mélange naturellement. La figure 155 indique les dispositifs à prendre ; ces dispositifs varient suivant la grandeur et la forme des vases de cultures ; il est facile de les disposer dans le sens voulu. La lessive alcaline n'est ajoutée qu'en dernier ; il peut même être préférable d'ajouter la potasse en morceaux, l'action se faisant plus lentement, puis le vase externe est immédiatement bouché et luté au suif ; la liqueur brunit très vite par suite de l'absorption de l'oxygène. Pour un espace de 100 centimètres cubes à peu près, on emploie 1 gramme d'acide pyrogallique que l'on dissout dans 10 centimètres cubes d'eau et environ 10 centimètres cubes de lessive de potasse au dixième. Au bout d'un jour, il n'y a plus trace d'oxygène. Pour les petites cultures, la figure 155 indique nettement comment il est possible de procéder ; le tube est placé dans un tube plus grand où l'on verse les substances qui doivent réagir, l'acide pyrogallique d'abord, la potasse en dernier lieu, immédiatement avant de boucher le vase extérieur avec un bon bouchon de caoutchouc.

(1) Büchner, Eine neue Methode zur Kultur anaërober Mikroorganismen (*Centralbl. für Bakt.*, IV, 1889).

On peut disposer de même, sous une cloche, des boîtes de Petri pour cultures sur plaques.

Herman (1) met la culture et la solution d'acide pyrogallique alcaline dans deux vases à tubulure reliés entre eux par un col recourbé ; les tubulures permettent l'action sur la culture d'un côté et l'introduction du réactif de l'autre.

5° *Méthodes basées sur l'emploi de microbes aérobie ou des parties de tissus animaux ou végétaux.* La propriété qu'ont les aérobies vrais d'absorber en un temps assez court tout l'oxygène en dissolution dans un milieu où ils se développent a été utilisée pour procurer un terrain favorable aux anaérobies. C'est du reste ce qui se passe à tout instant dans la nature. Dans bien des putréfactions, par exemple, les espèces très avides d'air envahissent rapidement le liquide qu'elles troublent uniformément. Tant qu'il y a de l'oxygène dissous, elles y végètent abondamment dans toutes les directions. Au fur et à mesure que ce gaz disparaît, les Bactéries quittent les couches profondes et se rapprochent de la surface où il en existe encore. Bientôt on n'en trouve plus qu'à la surface en contact direct avec l'air où elles forment une couche plus ou moins épaisse ou un voile continu ; le liquide s'est éclairci, toutes les cellules qu'il contenait sont tombées au fond du vase, mortes asphyxiées, ou ayant donné des spores, et de plus il y a absence totale d'oxygène dans son intérieur, le voile épais formé à la surface en interdisant l'accès. C'est le moment propice pour les anaérobies. S'il en existe des spores, elles germeront dès que l'oxygène aura disparu et pourront continuer longtemps à se multiplier, protégées de l'air par le voile formé d'aérobies, qui consomment l'oxygène au passage. L'expérience réussit au mieux si on la provoque. En semant du *Bacillus subtilis* dans du bouillon, le liquide s'est éclairci au bout de quelques jours et montre à sa surface une membrane épaisse et ridée ; les anaérobies s'y développent alors aussi bien que dans un vase vide d'air ou rempli de gaz inerte. Liborius (2) a appliqué avec succès ce principe à la culture des anaérobies dans les milieux solides. Il est arrivé à en obtenir de belles colonies dans des cristallisoirs pleins de gélatine, à la surface desquels il avait fait végéter des Bactéries de putréfaction très avides d'oxygène. Debrand (3) a montré que les cultures en bouillon du *Bacille du tétanos* s'obtenaient très aisément en usant de la symbiose du *Bacillus subtilis* ou d'une autre espèce voisine, comme le *Bacillus mesentericus vulgatus* ; la toxine tétanique obtenue dans ces conditions est tout aussi active que celle obtenue par un autre procédé.

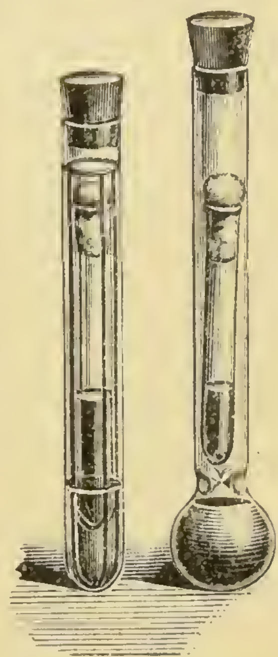


Fig. 155. — Cultures d'anaérobies à l'aide du pyrogallate de potasse.

L'expérience démontre qu'un anaérobie strict peut vivre indéfiniment

(1) Herman, Nouveau dispositif pour la culture des anaérobies (*Bull. de l'Acad. royale de méd. de Belgique*, 27 avril 1901).

(2) Liborius, Beiträge zur Kenntniss des Sauerstoffbedürfnisses der Bacterien (*Zeitschr. für Hygiene*, I, 1re p., p. 115, 1886).

(3) Debrand, Sur un nouveau procédé de culture du Bacille du tétanos (*Ann. de l'Inst. Pasteur*, XIV, 1900, p. 757).

dans un milieu et y pulluler, s'il est protégé de l'action de l'oxygène par une association d'aérobies. Le fait est bien dû, comme l'avait dit Pasteur, à la simple absorption de l'oxygène par les éléments aérobies voisins; Scholtz (1) vient encore d'en donner la preuve, infirmant l'opinion de Kedrowsky (2), qui soutenait qu'il était dû à la production par les aérobies d'un ferment particulier, permettant aux anaérobies de vivre en présence d'oxygène.

C'est aussi à la désoxygénation du milieu, produite par des substances réductrices bien peu connues, qu'il faut rapporter l'observation du développement des anaérobies dans des milieux ordinaires, bouillon ou gélose, exposés à l'air, auxquels on a ajouté des parties de tissus animaux ou végétaux.

Tarozzi (3) a réussi en employant des milieux renfermant des fragments d'organes parenchymateux, foie, rein, rate, ganglions, fraîchement excisés chez un animal sain, lapin, cobaye ou souris par exemple. Baudini (4) a montré qu'on pouvait obtenir les mêmes résultats en stérilisant les tubes de bouillon additionnés de ces fragments, pendant trente minutes à 110°, et que le liquide de macération d'organes, tamisé et centrifugé, agissait de même.

Wrzosek (5) obtient la même chose avec des fragments de tissu végétal, la pomme de terre par exemple, en prenant 1 gramme au moins de pomme de terre pour 10 centimètres cubes de bouillon, soit à l'état cru, soit après stérilisation à 120° pendant quinze minutes. D'après lui, on peut très bien employer des fragments de jaune ou de blanc d'œuf cuits ou de tissus animaux putréfiés.

Pfuhl (6) obtient des cultures très abondantes, surtout du *Bacille du tétanos*, du *Vibrion septique*, du *Bacille du charbon symptomatique*, du *Bacillus putrificus coli*, à l'aide d'une macération de foie peptonisée, filtrée et stérilisée à l'autoclave; ou bien avec du bouillon auquel il ajoute une goutte d'hépine, sorte de catalase, préalablement stérilisée.

Kata (7) et Marino (8) recommandent le bouillon additionné de sérum frais, en proportion de 5 centimètres cubes de sérum pour 15 centimètres cubes de bouillon, le mélange étant stérilisé pendant une heure à 100°.

(1) SCHOLTZ, Ueber das Wachsthum anaërober Bakterien bei ungehinderten Luftzustritt (*Zeitschr. für Hygiene*, XXVII, 1898, p. 131).

(2) KEDROWSKY, Ueber die Bedingungen, unter welchen anaërobe Bakterien auch bei Gegenwart von Sauerstoff existiren können (*Zeitschr. für Hygiene* XX, 1895,).

(3) TAROZZI, Ueber ein leicht in aërober Weise ausführbares Kulturmittel von einigen bis jetz für strenge Anaëroben gehaltenen Keimen (*Centralbl. für Bakt.*, I, Orig., XXXVIII, 1905, p. 619).

(4) BAUDINI, Ricerche sulla coltivazione degli anaerobi (*Acad. di med. di Torino*, 1906, XII, fasc. 6).

(5) WRZOSEK, Ueber das Wachstum obligate Anaeroben auf Kulturmitteln aerober Weise (*Wien. klin. Wochenschr.*, 1905, XVIII, n° 58). — Wachstum obligatorischer Anaeroben in aerober Weise (*Centralbl. für Bakt.*, I, Orig., XLIII, 1906, p. 17; XLIV, 1907, p. 607).

(6) PFUHL, Die Züchtung anaërober Bakterien in Leberbouillon, sowie in Zuckerbouillon und in gewöhnlichen Bouillon mit einem Zusatz von Platinschwamm oder Hepin unter Luftzutritt (*Centralbl. für Bakt.*, I, Orig., XLIV, 1907, p. 378).

(7) KATA, Ueber eine einfache Methode zur aërobischen Kultivierung der Anaëroben, mit besonderer Berücksichtigung ihrer Toxinproduktion (*Centralbl. für Bakt.*, I, Orig., XLVI, 1908, p. 539).

(8) MARINO, Culture des anaérobies (*Soc. de biol.*, LXVII, 1909, p. 664).

Seulement, dans toutes ces conditions, on n'obtient jamais de cultures en surface, avec la gélatine ou la gélose; uniquement en piqûre profonde, dans les couches inférieures, ou dans le liquide si c'est un bouillon que l'on emploie.

On avait voulu rapporter ce développement d'anaérobies en présence d'air à la diffusion dans le liquide d'un ferment spécial; il semble bien que ce soit la seule absorption de l'oxygène qui intervienne.

Ce sont là des procédés qui peuvent être commodes à utiliser pour la préparation de grandes quantités de toxines, par exemple.

Pour obtenir facilement une culture d'un microbe anaérobie qui puisse servir à se familiariser avec ces différents procédés, Würtz conseille d'immerger dans un tube à essai rempli aux trois quarts de gélose bouillante un ou deux haricots ordinaires. En mettant ce tube à l'étuve à 37°, le lendemain on doit avoir une culture abondante de *Bacillus butyricus*. On peut aussi s'adresser au *Vibrion septique*, que l'on obtient souvent du premier coup en inoculant à un cobaye, dans une petite boutonnière de la peau du ventre, une petite quantité de terre de jardin; la mort survient le plus souvent en trente-six heures; le sang ou la sérosité péritonéale servent de matière d'ensemencement. La terre, les matières fécales diverses, contiennent beaucoup d'anaérobies intéressants à étudier.

En combinant ces procédés, on peut facilement obtenir des *cultures sur plaques* à l'abri de l'oxygène. Ces cultures, faites à l'aide de gélatine ou de gélose au mieux glucosées à 2 p. 100, bouillies et refroidies au degré voulu en présence d'hydrogène, sont placées sur une étagère, sous une cloche dont la base plonge dans un cristallisoir renfermant un peu de vaseline liquide. Cette cloche est traversée par un courant d'hydrogène que l'on peut supprimer après une demi-heure environ; elle peut en outre contenir une capsule dans laquelle on dépose en dernier un mélange de solution d'acide pyrogallique et de lessive de potasse destiné à absorber les dernières traces d'oxygène. Si l'on emploie les boîtes de Petri, il faut les disposer de façon que leur obturation ne se fasse pas bien, en maintenant le couvercle légèrement soulevé par exemple, pour que la réaction puisse opérer sur l'air qui s'y trouve.

Marino (1) ensemence dans de la gélose glucosée, comme dans le procédé Veillon (p. 303), puis coule dans la partie supérieure d'une boîte de Petri stérilisée et applique à la surface le fond de la partie inférieure; le milieu se trouve pressé entre deux surfaces de verre stériles. On met à l'étuve en couvrant le tout d'un couvercle de verre. Les colonies se développent; pour les prélever, on sépare doucement les surfaces de verre. Malheureusement, la gelée se disloque souvent; le prélèvement expose à des contaminations par l'air.

L'isolement des anaérobies peut se faire aisément aussi en usant soit du procédé de Vignal (p. 300), soit, mieux, de celui de Veillon (p. 303), qui remplacent avantageusement dans ce but les cultures sur plaques.

On peut employer, pour l'observation des anaérobies sous le microscope, la chambre à gaz de Ranvier décrite précédemment (p. 280). Les deux tétons latéraux du porte-objet métallique sont mis en communication

(1) Marino, Méthode pour isoler les anaérobies (*Ann. de l'Inst. Pasteur*, XXI, 1907, p. 1005).

avec la source de gaz, hydrogène, acide carbonique ou azote. La culture se trouve complètement baignée par le gaz choisi. On suit facilement ainsi les phases intéressantes du développement d'espèces que l'oxygène tue, la division et la formation des spores surtout. On peut le faire tout aussi facilement à l'aide des lentilles de verre soufflées et aplaties dont Pasteur s'est servi au début de ses recherches sur les anaérobies, en particulier sur la fermentation butyrique.

Il est du reste facile d'imaginer, pour l'obtention de cultures et l'isolement des microbes anaérobies, beaucoup d'autres petits dispositifs particuliers répondant à des besoins spéciaux; certains seront indiqués lors de la description de quelques espèces. On trouvera des indications complémentaires dans des mémoires de Ucke (1), Trenkmann (2), Marpmann (3), Epstein (4), Hammerl (5), Turro (6) et autres, dans une très bonne revue générale de Hunziker (7), dans les ouvrages de von Hibler (8) et de Jungano et Distaso (9).

On a vu précédemment (p. 46) que G. Rosenthal serait arrivé, par adaptation progressive, à faire vivre beaucoup d'espèces anaérobies en vie aérobie, en cultures ordinaires en présence d'air. Cette adaptation s'obtiendrait surtout par des cultures successives en gamme ascendante de pression en tubes scellés et en gamme descendante de hauteur en tubes de Veillon. Ces faits, de haute importance, demandent à être répétés et étendus.

4. CULTURES DANS LES MILIEUX COLORÉS

En ajoutant des matières colorantes diverses aux milieux de cultures et y ensemençant des Bactéries, on peut observer des modifications importantes de la couleur, variations de teintes, décoloration, recoloration, corrélatives au développement du microbe. Ces réactions peuvent renseigner sur la biologie de l'espèce en culture ou servir à sa différenciation d'espèces voisines par d'autres caractères.

Duclaux a fait connaître une des premières applications de cette méthode en provoquant le développement de diverses espèces dans des milieux, le lait surtout, colorés à l'aide de *teinture de tournesol* dont la nuance varie selon que le milieu est acide ou alcalin. Il ne faut pas ajouter la teinture de tournesol avant la stérilisation, le chauffage pouvant produire une décoloration ou un virage ; mais ajouter au milieu déjà stérilisé, une quantité de teinture stérilisée suffisante pour lui donner une

(1) Ucke, Eine Beitrag zur Kenntniss der Anaëroben (*Centralbl. für Bakt.*, XXIII, 1898, p. 996).
(2) Trenkmann, Das Wachsthum der anaëroben Bakterien (*Ibid.*, p. 1038).
(3) Marpmann, Eine neue Method zur Herstellung von anaëroben Rollglaskulturen mit Gelatine und Agar (*Ibid.*, p. 1090).
(4) Epstein, Apparat zur Kultur anaërober Bakterien (*Ibid.*, XXIV, 1898, p. 266). — Id., Ein Verfahren zur Züchtung anaërober Bakterien in Doppelschalen (*Ibid.*, XXVIII, 1900, p. 443).
(5) Hammerl, Ein Beitrag zur Züchtung der Anaëroben (*Ibid.*, XXX, 1901, p. 658).
(6) Turro, Zur Anaërobenkultur (*Ibid.*, XXXI, 1902, p. 175).
(7) Hunziker, Review of the existing methods for cultivating anaerobic Bacteria (*Journal of applied Microscopy*, Rochester, New-York, V, n° 3, 1902).
(8) Von Hibler, Untersuchungen über die pathogenen Anaëroben. Iena, Fischer, 1908.
(9) Jungano et Distaso, Les anaérobies. Paris, Masson, 1910.

nuance bien franche. C'est surtout de la teinture de tournesol bleue qu'on se sert; elle vire au rouge lorsque le microbe produit de l'acide aux dépens du milieu. Comme cette production d'acide se fait surtout avec les sucres, il est nécessaire qu'il y en ait dans le milieu employé. Aux milieux qui n'en contiennent pas, il faut alors ajouter 2 p. 100 de matière sucrée, lactose ou glucose, suivant le besoin. On a ainsi des gélatine, gélose, bouillon, lactosés ou glucosés. Ces milieux, ou d'autres milieux sucrés naturels comme le lait, bien stérilisés, sont alors additionnés, à l'aide d'une pipette stérilisée, d'une quantité suffisante de teinture de tournesol préalablement stérilisée à l'autoclave par petites quantités.

La *gélose tournesolée*, glucosée ou lactosée, est un milieu d'emploi courant. Le milieu de Drigalski-Conradi, employé pour la recherche du *Bacille typhique*, n'en est qu'une simple variété.

D'autres colorants, et en particulier des couleurs d'aniline, peuvent être employés dans des buts similaires. Les décolorations ou changements de nuance se produisent alors, le plus souvent, sous l'influence de processus de réduction ou d'oxydation que la vie microbienne produit dans la culture. Il y a même parfois absorption et en quelque sorte condensation de la matière colorante par le microbe; le milieu se décolore progressivement, en même temps que les éléments microbiens fixent pour ainsi dire la couleur.

Spina (1) avait observé qu'en colorant de la gélatine ou de la gélose avec quelques gouttes de solution concentrée de sulfo-indigotate de soude ou de bleu de méthylène, et en y ensemençant certaines Bactéries, on voyait au bout de peu de temps la nuance changer considérablement à la suite de la prolifération de la Bactérie. D'Abundo (2) avait remarqué que, dans un milieu coloré avec un peu de fuchsine, de bleu de méthylène ou de brun de Bismarck, où était ensemencé du *Bacille typhique*, il se produisait en quelques jours une décoloration pendant que les microbes prenaient fortement la matière colorante. Noeggerath (3) songea le premier à appliquer ces caractères au diagnostic différentiel de certaines espèces, et en particulier du *Bacille typhique*, si difficile à reconnaître d'espèces voisines.

Ce dernier auteur mélange dans l'ordre cité les quantités suivantes de solutions aqueuses saturées de plusieurs couleurs d'aniline :

Bleu de méthylène	2 centimètres cubes.
Violet de gentiane	4 —
Vert de méthyle	1 centimètre cube.
Chrysoïdine	4 centimètres cubes.
Fuchsine	3 —

puis complète à 200 centimètres cubes avec de l'eau distillée. Le liquide (*Liquide de Noeggerath*) a une coloration brunâtre tirant sur le bleu et colore le papier à filtrer en gris foncé ou bleu noirâtre. Il est préférable de le conserver une quinzaine de jours avant de s'en servir : il se produit pendant ce temps des modifications de couleur que l'on corrige en ajoutant un peu de l'une ou l'autre des couleurs, de manière à revenir à peu près à la nuance première.

(1) Spina, Bacteriologische Versuche mit gefärbten Nährsubstanzen (*Centralbl. für Bakt.*, II, 1887, p. 71).
(2) D'Abundo, *La Riforma medica*, déc. 1887.
(3) Noeggerath, *Fortschr. der Med.*, 1887, p. 1, et *Centralbl. für Bakt.*, III, p. 481.

A un tube à essai de gélatine liquéfiée, il ajoute de sept à dix gouttes de la solution et coule le mélange dans un godet ou sur une plaque de verre. La Bactérie à étudier est inoculée à la surface par plusieurs stries. La culture provoque d'intéressantes modifications de couleur ; d'ordinaire, elle forme une bande colorée entourée d'un liséré plus clair. Pour le *Bacille typhique* en particulier, la culture se colore en violet-évêque et le milieu se décolore autour d'elle. Un Streptocoque isolé du mucus utérin dans un cas de fièvre puerpérale donne une culture d'un rouge orangé.

Dans les milieux liquides, c'est le dépôt qui se forme d'ordinaire au fond du vase qui se colore, le liquide se décolore peu à peu.

Gasser (1) a obtenu de meilleurs résultats pour le *Bacille typhique* en se servant uniquement de fuchsine ajoutée au milieu jusqu'à production d'une belle teinte rouge. En plaçant à l'étuve à 37° des plaques de gélose colorées à la fuchsine, inoculées en stries avec du *Bacille typhique*, la culture qui se forme prend au bout de deux jours une teinte rouge très manifeste, tandis que la gelée se décolore tout autour. La fixation de la couleur par la culture continue à se faire les jours suivants; six ou huit jours après, toute la gelée est décolorée. Des espèces voisines de celle en question présentèrent des réactions toutes différentes.

Ramond (2) conseille l'emploi de rubine acide ; Robin (3) celui du bleu de méthylène.

Rothberger (4) a étudié les caractères des cultures d'une série d'espèces, *Colibacille*, *Bacille typhique*, *Pneumobacille*, *Bacille virgule du choléra* et autres similaires, sur des milieux additionnés de couleurs d'aniline très diverses et en a tiré des indications pouvant être utiles pour la diagnose de ces espèces. En particulier, il signale que le *Colibacille* agit sur le neutralroth en changeant la couleur rouge-rubis en une teinte fluorescente verte ou une nuance jaune-canari, tandis que le *Bacille typhique* ne modifie en rien le milieu.

Des couleurs d'aniline, complètement décolorées par des agents chimiques, les sulfites alcalins par exemple, peuvent reprendre leur nuance sous l'influence d'un développement microbien qui occasionne une production d'acide dans le milieu (procédé d'Endo pour la diagnose du *Bacille typhique* et du *Colibacille*).

La cause des phénomènes ainsi produits est peu connue. Elle est peut-être liée à une oxydation ; de semblables milieux exposés à l'air se décolorent en effet au bout d'un temps assez long sans qu'aucune Bactérie se développe dans leur masse. Mais, la plupart du temps, la modification est due à la production d'acides dans le milieu, acides formiques, acétique et surtout lactique ou butyrique, qui se fait à la suite de l'attaque par le microbe des hydrates de carbone, en fait des sucres, qui s'y trouvent. On rend la réaction plus intense et plus hâtive en

(1) Gasser, Thèse de Paris, et Culture du Bacille typhique sur milieux nutritifs colorés (*Arch. de méd. expér.*, II, 1890, p. 750).

(2) Ramond, *Presse méd.*, 1896, p. 392.

(3) Robin, Sur un nouveau milieu coloré pour la différenciation du Colibacille et du Bacille d'Eberth (*Soc. de Biol.*, 26 janvier 1897).

(4) Rothberger, Differenzialdiagnostische Untersuchungen mit gefärbten Nährböden *Centralbl. für Bakt.*, XXIV, 1898, p. 513 ; XXV, 1899, p. 15 et 69).

ajoutant au milieu une petite quantité du sucre qui se trouve surtout modifié par le microbe. Comme il est des espèces qui font fermenter certains sucres et pas d'autres, on peut trouver là de précieux éléments de différenciation.

Ces cultures en milieux colorés sont surtout employées pour l'identification et la différenciation du *Bacille typhique*, du *Colibacille*, des *Bacilles dysentériques*, du *Méningocoque*. Des détails complémentaires seront donnés lors de l'étude de ces espèces.

5. ENSEMENCEMENT DES CULTURES ET ISOLEMENT DES ESPÈCES

Prenons, pour commencer, le cas le plus simple, où l'on a affaire à une espèce pure parfaitement isolée, ou à une substance n'en renfermant qu'une seule. Les conditions à remplir sont de prendre de cette matière d'inoculation sans y mêler de germes étrangers et de transporter la partie recueillie dans un milieu de culture rigoureusement stérilisé, sans introduire en même temps de Bactéries du dehors, qui viendraient fausser les résultats. Ces trois propositions, *pureté de la matière à ensemencer*, *stérilité absolue du milieu de culture*, *possibilité d'introduction de germes étrangers dans la manipulation,* doivent être continuellement présentes à l'esprit de l'observateur, qui s'efforcera toujours d'éviter, dans la mesure du possible, des causes d'erreurs aussi explicables.

Pour puiser de la matière à inoculer, on se sert avantageusement d'une aiguille en fil de platine, que l'on confectionne en fixant un fil assez fort, de 5 à 6 centimètres de longueur, dans une tige de bois ou dans une baguette de verre rougie au feu (fig. 156). L'extrémité peut être droite, recourbée en crochet ou en *anse* (*öse*) simple ou double. Cette dernière disposition est commode pour prendre des liquides dont on veut une certaine quantité. A recommander de *ne jamais omettre de stériliser l'aiguille, en la faisant rougir dans la flamme*, *avant et après chaque opération*; on la laisse refroidir quelques secondes avant de s'en servir. On doit avoir de ces fils de différentes grosseurs pour les diverses opérations où on les emploie; les fils fins, se refroidissant vite, doivent servir pour les ensemencements; ils ne doivent cependant pas être assez fins pour plier lorsqu'on les enfonce dans un milieu solide comme les gelées habituelles. De gros fils aplatis en spatule à l'extrémité sont souvent fort utiles. L'aiguille de platine peut être remplacée par toute aiguille de métal pouvant être chauffée au rouge; cependant, les autres métaux, traités de cette façon, s'altèrent trop vite. On peut aussi employer des baguettes de verre de petit diamètre, étirées à leur extrémité.

Lorsqu'il s'agit de liquides dont on veut recueillir une certaine quantité, ou, à plus forte raison, qu'on doit transporter, il faut les récolter à l'aide de pipettes de verre soigneusement stérilisées. On peut prendre de toutes petites pipettes du commerce, de un demi ou de un centimètre cube; il est plus facile d'en fabriquer soi-même (fig. 160, p. 318), qui répondent bien mieux au besoin, en étirant à la flamme des tubes de verre de petit diamètre. On leur donne la longueur nécessaire, on en ferme à la flamme l'extrémité effilée et l'on bouche l'autre avec un tampon de coton. On en stérilise un certain nombre en provision, en les

plaçant dans une boîte métallique ou dans une grosse éprouvette de verre bouchée avec du coton, et en les soumettant, pendant une heure ou une heure et demie, à une température de 150° environ dans le stérilisateur à air chaud. Pour faire la prise de liquide, on casse la pointe effilée, après l'avoir chauffée dans une flamme, et on la plonge dans le liquide ; on peut aspirer légèrement par l'extrémité opposée ou laisser le liquide monter par capillarité. La pointe peut être fermée à nouveau au feu et le contenu conservé le temps voulu, complètement à l'abri des germes étrangers. On fabrique facilement de petites ampoules, dites *ampoules à vaccin*, en étirant un tube aux deux bouts.



Fig. 156. — Aiguille en fil de platine.

Pour ensemencer le milieu de culture, lorsqu'il s'agit d'un milieu liquide, on débouche avec soin le vase qui le contient et l'on agite l'aiguille qui porte la parcelle d'inoculation, de façon à la dissocier dans la masse ; le vase est ensuite rapidement fermé. Si la substance à inoculer a été récoltée dans une pipette de verre, comme nous venons de l'indiquer, la pointe étirée est chauffée dans la flamme, puis brisée après refroidissement, avec une pince flambée : une gouttelette vient sourdre à l'extrémité; on ensemence comme avec l'aiguille de platine, en prenant les mêmes précautions. Le liquide est parfois trop visqueux pour sortir de la pointe capillaire ; on souffle alors légèrement dans la pipette par l'extrémité opposée munie du tampon d'ouate. Il est à recommander, dans ces opérations, de tenir le vase légèrement incliné pour éviter le plus possible la chute des poussières de l'air par son ouverture.

Pour inoculer les milieux solides, on frotte à leur surface ou l'on introduit dans leur masse la pointe de l'aiguille ou de la pipette, chargée de la substance à ensemencer. Quand ce sont des tubes contenant des gelées solidifiées, l'inoculation peut se faire par *piqûre* (*Stichcultur*), lorsque le tube a été refroidi dans la position droite (fig. 157) ; l'aiguille est enfoncée dans la gelée, perpendiculairement à la surface, d'une profondeur variable ; on peut faire simplement un point ou tracer une piqûre de plusieurs centimètres. Quand les tubes ont été placés dans une position inclinée pour disposer d'une plus grande surface de gelée, l'inoculation se fait en traçant un ou plusieurs *traits* ou *stries* (*Strichcultur*) sur la surface de la gelée (fig. 158) ; l'aiguille doit toujours entamer au moins un peu la surface du milieu, de manière à mettre la semence en contact avec une couche qui n'est pas desséchée, ce qui arrive souvent à la surface, lorsque les tubes sont conservés depuis quelque temps. Pendant l'opération, le tube doit toujours être tenu horizontalement ou, aussi, l'orifice tourné vers le bas; nous verrons, en effet, qu'on évite ainsi la contamination par les germes de l'air, qui, lorsque l'atmosphère est calme, tombent toujours suivant la verticale. La bourre d'ouate, fermant le tube, a été enlevée au début et placée entre deux doigts de la main gauche qui maintient le tube à inoculer, de façon à éviter le con-

tact de sa partie inférieure avec la main. Aussitôt l'inoculation faite, elle est remise en place, avant que le tube soit redressé, après qu'on a pris soin de la flamber légèrement.

On opère de même pour ensemencer d'autres milieux solides. Il est souvent avantageux de mêler plus intimement la substance d'inoculation au milieu. Pour les cultures sur pomme de terre, par exemple, on peut prendre la semence avec un scalpel ou une petite spatule et l'étendre à la surface de toute la culture, en la mélangeant à la couche superficielle qu'on racle légèrement.

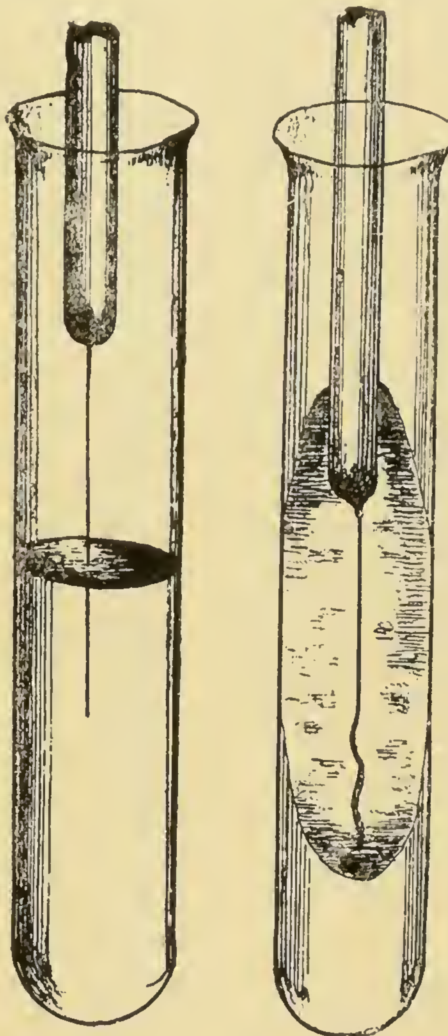


Fig. 157. — Inoculation en piqûre. Fig. 158. — Inoculation en strie.

Lorsqu'on doit puiser la matière à inoculer dans les tissus ou dans un organe, le manuel opératoire se complique beaucoup à cause des nombreuses contaminations possibles par les espèces qui foisonnent au voisinage. On a surtout à recueillir, dans ce but, du sang, du pus, des exsudats du nez ou de la gorge, du liquide de pleurésie ou d'ascite, du liquide céphalo-rachidien, à faire une ponction de rate, de foie ou de poumon.

Prélèvement de sang. — Pour recueillir du sang, la peau de l'endroit où l'on veut opérer est avant tout dégagée des poils qui peuvent s'y trouver, soit à l'aide de ciseaux courbes, soit à l'aide du rasoir, puis soigneusement lavée et brossée au savon et à l'eau tiède, frottée avec une solution de sublimé ou d'oxycyanure de mercure, puis lavée à l'alcool et à l'éther qui s'évapore très rapidement. On a recommandé aussi, quelques minutes avant l'opération, un large badigeonnage de teinture d'iode, qui fait pénétrer dans l'épaisseur un antiseptique de valeur certaine.

Pour stériliser un très petit espace, suffisant par exemple pour une piqûre, on peut brûler la peau à l'aide d'un thermocautère ou d'une tige de fer chauffée au rouge ; l'avantage est d'agir sur une certaine profondeur.

Piqûre de la peau. — On pique le doigt, de préférence sur la face dorsale, près de l'ongle avec une aiguille, une lancette, un vaccinostyle ou avec l'extrémité d'une pipette très finement effilée, le tout dûment stérilisé. Lorsqu'on veut du sang en petite quantité, on le recueille facilement à l'extrémité d'un doigt, dont on comprime la base pour faire affluer le sang au bout. La peau est piquée avec une aiguille ou un scalpel stérilisés ; les premières gouttes de sang doivent être laissées ; lorsqu'on peut le faire, on ne se sert que des suivantes qui seront inoculées immédiatement ou enfermées dans des pipettes stérilisées dans lesquelles on les aspire. Les modèles de pipettes et tubes dits *à vaccin*

représentés figure 160 (p. 318) conviennent parfaitement. On les prépare facilement soi-même avec des tubes de verre et une lampe d'émailleur ; la manière de s'en servir se conçoit d'elle-même. Les modèles représentés figure 161 servent à recueillir une plus grande quantité de liquide. On munit leur bout supérieur d'un tampon d'ouate et l'on stérilise à l'air chaud. Pour ne pas risquer de se contaminer la bouche en aspirant, il est souvent prudent de munir le bout supérieur de la pipette d'un tube de caoutchouc souple assez long, à l'aide duquel se pratique l'aspiration. On peut aussi recueillir simplement le sang qui s'écoule dans de petits tubes stérilisés.

Emploi de la ventouse. — On lave et on aseptise comme il vient d'être dit la peau du dos ou du thorax sur un espace de la grandeur de la main et on y applique une ventouse stérilisée à la chaleur. Lorsque la ventouse a pris, on l'enlève avec soin, on scarifie au milieu de l'élevure avec un couteau stérilisé et on replace aussitôt une nouvelle ventouse stérilisée. Le sang s'accumule dans cette dernière que l'on détache avec soin et recouvre d'un capuchon de papier stérilisé.

Ponction veineuse. — C'est le procédé le plus sûr, qui permet en outre d'obtenir d'assez fortes quantités de sang. On se sert d'une seringue stérilisable, munie d'une aiguille bien coupante, que l'on stérilise à l'eau bouillante ou, mieux, à l'autoclave à 115°.

On choisit une veine superficielle : chez l'homme, une veine du bras ; chez le lapin, une veine de l'oreille. Si l'on doit s'adresser à une veine plus profonde, chez le cobaye et le lapin la jugulaire, chez le chien la saphène externe, il faut inciser la peau et découvrir la veine.

Pour recueillir du sang au bras chez l'homme, on aseptise la peau de l'avant-bras à l'endroit de la saignée; on comprime la partie moyenne du bras de façon à faire saillir les veines; on choisit la veine la plus grosse et la plus turgescente et on pique avec l'aiguille de façon à traverser la peau, puis la paroi veineuse ; on enfonce un peu l'aiguille parallèlement à la veine et on aspire en tirant lentement sur le piston ; le sang remplit facilement la seringue. On retire l'instrument et on chasse immédiatement le sang dans un vase stérilisé ou le milieu de culture choisi pour qu'il ne se coagule pas dans la seringue.

Pour prélever du sang dans une veine de l'oreille d'un lapin, on choisira de préférence une veine marginale bien visible. La peau est rasée et aseptisée ; on exerce une compression à la base de l'oreille avec une pince et on procède comme pour l'homme. On peut ainsi facilement recueillir de 15 à 20 centimètres cubes de sang.

Lesieur (1) conseille d'appliquer des sangsues et de recueillir aseptiquement le sang qu'elles ont absorbé. Les microbes du tube digestif de l'animal ne gêneraient en rien et, de plus, la coagulation du sang étant empêchée, l'examen microscopique et les manipulations ultérieures sont grandement facilités.

Prélèvement de pus. — La peau est aseptisée après avoir été rasée s'il en est besoin. On peut piquer avec une seringue ou une pipette stérilisée et aspirer, si le pus est bien liquide. Ou bien inciser la peau, ouvrir la collection et prélever du pus avec le fil de platine ou des pipettes de verre.

(1) Lesieur, Recherche des microbes dans le sang; procédé de la sangsue (*Bull. de la Soc. méd. des hôp. de Paris*, 15 juillet 1904, p. 827).

Prélèvement d'exsudats du nez ou de la gorge. — On se sert d'un petit tampon d'ouate, monté sur un fil de fer assez long, 10 à 15 centimètres (fig. 159), que l'on a stérilisé à la chaleur dans un tube à essai bouché d'ouate hydrophile. On frotte assez fortement le tampon sur l'endroit suspect et on s'en sert pour ensemencer directement les milieux voulus. Pour aborder facilement le rhino-pharynx, on courbe de façon suffisante le fil de fer avec une forte pince.

Prélèvement de sérosités pleurales, d'ascite, etc. — On peut prélever de l'épanchement pleural à l'aide d'une seringue stérilisée munie d'une aiguille un peu forte de 7 à 8 centimètres de long. La peau est aseptisée, puis on pousse franchement l'aiguille dans un espace intercostal et on aspire.

On opère de même pour le liquide d'ascite. Pour en recueillir de fortes quantités, on ponctionne avec un trocart, comme il a été dit page 238.



Fig. 159. — Tube et tampon pour prélèvement d'exsudats.

Ponction de la rate, du foie, du poumon. — Il faut délimiter la rate par percussion et aseptiser la peau soigneusement. On prend une seringue stérilisée qui porte, à l'extrémité d'un ajutage en caoutchouc, une aiguille d'acier assez fine et neuve. L'aiguille est enfoncée perpendiculairement à la peau, en pleine matité splénique. Avoir soin de bien immobiliser le patient. On n'obtient qu'une très petite quantité de sang.

On agit de même pour la ponction du foie et du poumon.

Cette ponction d'organes profonds peut se faire sans crainte, pourvu qu'on opère avec une antisepsie rigoureuse. Il faut munir la seringue d'une aiguille d'acier assez forte, au besoin d'un petit trocart; la stérilisation doit être parfaitement assurée. L'aspiration avec la seringue doit être très minime et prudente; le plus souvent on n'obtient guère de liquide que dans l'aiguille. Aussi doit-on y veiller soigneusement; l'ensemencement peut s'en faire avantageusement, sans rien en perdre, en faisant passer dans la canule du bouillon stérilisé, aspiré après coup dans le corps de seringue ou dans une autre seringue préparée d'avance.

Ponction lombaire. — L'opération a pris une très grande importance depuis que l'étude bactériologique du liquide céphalo-rachidien fournit de si précieux éléments de diagnostic pour les méningites cérébro-spinales épidémiques principalement (1).

(1) Anglada, Le liquide céphalo-rachidien et le diagnostic par la ponction lombaire. Paris, J.-B. Baillière, 1909. — Desfosses, Technique de la ponction lombaire (*Presse méd.*, 29 mai 1909).

Le liquide céphalo-rachidien est renfermé dans les ventricules et les espaces sous-arachnoïdiens. On peut atteindre le sac arachnoïdien en bien des endroits; on choisit la partie inférieure, lombaire, comme la plus facile. Chez l'adulte, la moelle épinière ne descend pas au-dessous de la deuxième vertèbre lombaire et le sac arachnoïdien va jusqu'à la deuxième pièce sacrée. Entre ces deux points, le sac ne contient que les nerfs de la queue de cheval; il n'y a donc aucun danger de piquer la moelle; on peut le ponctionner entre la deuxième et la troisième, la troisième et la quatrième, la quatrième et la cinquième vertèbre lombaire et entre la cinquième et le sacrum. Chez l'enfant, la moelle descend jusqu'entre la deuxième et la troisième vertèbre lombaire; on ne doit ponctionner que plus loin. Il est à conseiller de ponctionner entre la quatrième et la cinquième vertèbre lombaire ; le point se détermine aisément de la façon suivante : une ligne horizontale joignant la partie supérieure des deux crêtes iliaques passe par le tubercule de l'apophyse épineuse de la quatrième vertèbre lombaire qu'on peut marquer facilement.

Il faut donner au malade une position spéciale. On peut l'asseoir sur le bord du lit ou d'une table, les jambes pendantes, en lui faisant fléchir fortement le tronc et la tête en avant, faire le gros dos. Ou bien, s'il ne peut pas se lever, on le fait coucher sur le côté droit ou gauche en prenant la position en chien de fusil, courbant fortement en avant sa région dorsale et lombaire. Dans ces positions, les arcs vertébraux s'écartent les uns des autres, les ligaments sont bien tendus, les espaces intervertébraux augmentés.

La peau de la région est asepsiée assez largement comme il a été dit. Pour l'endroit même où l'on doit ponctionner, on peut employer le badigeonnage à la teinture d'iode. Chez les personnes très nerveuses, on peut faire l'anesthésie locale au chlorure de méthyle.

L'opérateur a préparé une seringue de dimensions voulues, 10 à 20 centimètres cubes, s'il doit recueillir une assez forte quantité de liquide, munie d'une assez forte aiguille, au moins de 7 centimètres de long, à extrémité taillée en biseau assez court, ou d'un petit trocart de l'appareil Dieulafoy par exemple. Le tout est bien stérilisé.

Après avoir aseptisé ses mains par un bon savonnage et un lavage au sublimé, l'opérateur repère avec l'index de la main gauche le tubercule de la cinquième vertèbre lombaire et enfonce l'aiguille, fortement tenue par sa base comme une plume à écrire, perpendiculairement à la peau, à 1 centimètre environ de la ligne médiane, en dehors et un peu au-dessus de ce tubercule. La peau est piquée brusquement, l'aiguille pénètre dans les muscles; au premier moment, le malade réagit souvent; avant d'aller plus loin, il faut le remettre en bonne position et attendre quelques instants pour voir disparaître la contracture. L'aiguille est alors enfoncée doucement en dedans et un peu en haut ; elle traverse les muscles; elle est arrêtée par un plan résistant, le ligament jaune qui est traversé au moyen d'une poussée un peu forte; on pousse encore un peu pour passer la dure-mère et l'arachnoïde et l'on est dans le sac arachnoïdien. Aussitôt le liquide s'écoule ou en gouttes ou en jet, suivant sa tension ; on aspire très doucement en retirant lentement le piston de la seringue.

Quelquefois on n'obtient pas aussi facilement le résultat cherché.

L'aiguille peut buter contre une résistance osseuse ; on ramène la pointe en arrière et l'on enfonce ensuite avec une meilleure direction. Il faut parfois recommencer le tout et faire une nouvelle ponction. On peut se trouver en présence de malformations osseuses rendant l'opération difficile ou même impossible. Il peut venir du sang, si l'aiguille a piqué une petite veine ; on retire alors petit à petit jusqu'à ce qu'il s'écoule du liquide clair. Il arrive que l'on n'obtienne rien du tout ; l'opération est à recommencer.

Ou bien on peut ponctionner sur la ligne médiane exactement, à un demi-centimètre au-dessous de la limite inférieure de la quatrième vertèbre lombaire ; on ne sent pas alors la résistance du ligament jaune, seulement celle du fourreau dural. En ponctionnant latéralement, on dispose d'un espace plus grand.

Après la ponction, on retire doucement l'aiguille, on tamponne avec un peu d'ouate ; quand les tissus sont lâches, on peut mettre un peu de collodion sur la piqûre. On doit recommander un repos de vingt-quatre ou quarante-huit heures. On observe parfois des accidents légers, de la céphalée, des vertiges, des nausées, quelquefois des fourmillements légers ou des crampes dans les membres inférieurs. On a même signalé des cas de mort à la suite de la ponction lombaire (1) ; ils se sont surtout produits chez des malades atteints de tumeurs cérébrales ; quelques-uns, cependant sont de mécanisme incertain. Il est prudent de ne pas soustraire trop de liquide, pas plus de 20 centimètres cubes, de ponctionner plutôt en décubitus et d'ordonner le repos au lit en maintenant la tête basse.

Le liquide peut être recueilli en le laissant couler directement de la canule dans un flacon stérilisé, ou aspiré avec la seringue et transvasé aussitôt dans le flacon stérilisé. Ce liquide peut être clair ou purulent, filamenteux, incolore, ou teint surtout en rouge ou rose par du sang. Il sera traité comme on l'indiquera pour chaque cas particulier (Voy. surtout à l'étude du *Méningocoque*).

Prélèvement, après la mort, dans des organes épais ou des morceaux de tissus. — Si l'on veut puiser dans l'intérieur d'un organe épais, foie ou rate, ou dans des tissus épais comme des masses musculaires, par exemple, on ne réussit d'habitude qu'en s'entourant de grandes précautions et en suivant les recommandations si bien indiquées par Gaffky (2). L'organe recueilli le plus tôt possible après la mort, immédiatement après lorsqu'il s'agit d'animaux d'expérience, est lavé à la surface avec une solution de sublimé à 1 p. 100, et, s'il doit être transporté, entouré d'un linge imbibé de la même solution. On doit mettre à sa portée, sur la table de travail, une provision de scalpels, des pinces et quelques aiguilles de platine stérilisés. Les instruments d'acier sont stérilisés dans une boîte en tôle ou dans une grosse éprouvette fermée avec un tampon d'ouate qu'on laisse une heure environ dans le stérilisateur à air chaud à 150°. On ne les prend qu'un à un, au fur et à mesure du besoin, en ayant soin chaque fois de fermer la boîte ou le tube, pour

(1) Minet et Lavoix, La mort, suite de ponction lombaire (*Écho méd. du Nord*, 25 avril 1909).

(2) Gaffky, Zur Ætiologie der Abdominaltyphus (*Mitth. aus dem kaiserl. Gesundheitsamte*, II, 1884).

éviter l'apport de germes de l'air. Une première coupe est faite perpendiculairement à la surface avec un scalpel *encore brûlant*; elle doit intéresser presque toute l'épaisseur de l'organe. A l'aide d'un *autre* scalpel refroidi, on fait une seconde section perpendiculaire à la première; une troisième coupe, faite avec un *nouvel* instrument dans un autre sens, met à découvert des couches plus profondes ; on en fera même une quatrième si c'est nécessaire. Chaque opération doit être exécutée avec un couteau fraîchement stérilisé; il est à conseiller de n'employer jamais deux fois le même instrument. C'est dans la dernière section que l'on recueille, à l'aide des aiguilles stérilisées, la substance d'inoculation, qui doit être introduite le plus rapidement possible et avec les plus grandes précautions dans les milieux de culture disposés à l'avance.

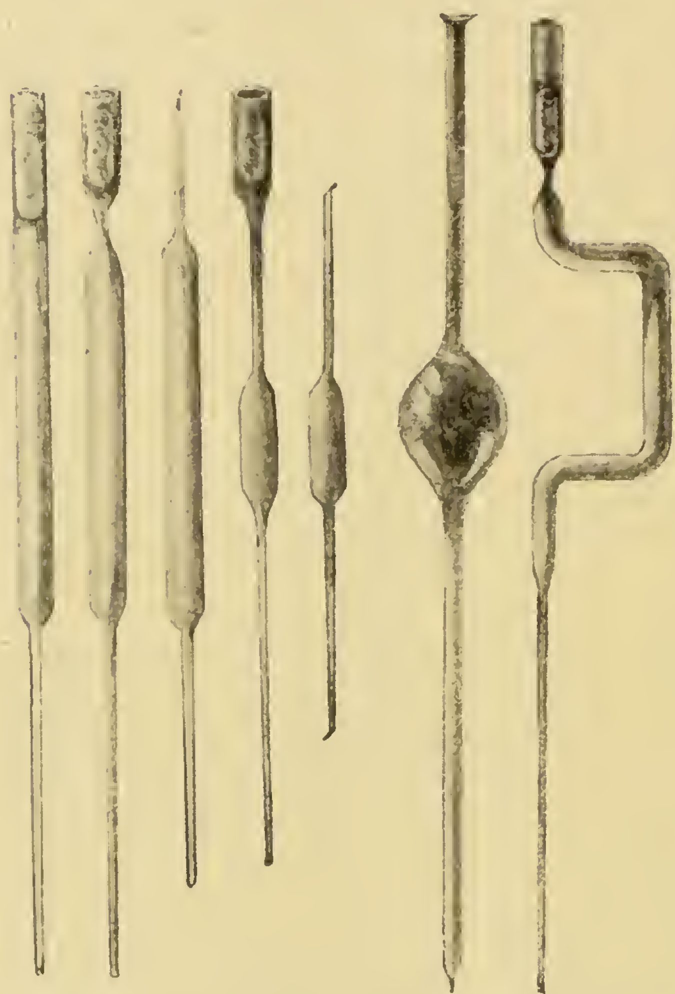


Fig. 160. — Pipettes et tubes à vaccin. Fig. 161. — Pipettes.

Les couteaux rougis des thermocautères sont d'un excellent usage pour pratiquer les premières incisions ; on ne doit jamais, cependant, prendre de substance à inoculer dans le voisinage immédiat des sections faites à leur aide, leur température élevée ayant pu agir sur les germes qui s'y trouvent.

Dans les opérations précédentes, nous avons admis que la matière à inoculer ne renfermait qu'une seule espèce de Bactéries, celle dont on veut obtenir une culture pure. C'est le cas le plus simple. On a fréquemment affaire à un mélange d'espèces qu'il faut alors isoler les unes des autres pour obtenir des cultures pures de l'une d'entre elles ou de chacune d'elles. Diverses méthodes peuvent conduire à les séparer. Le première en date est la méthode de *dilution dans les liquides* imaginée par Naegeli (1), appliquée et perfectionnée depuis par de nombreux observateurs, surtout Brefeld (2) et Miquel (3). Une faible parcelle de la substance à étudier est diluée avec soin dans une quantité de liquide stérilisé, eau ou bouillon, telle qu'on puisse être assuré qu'un volume déterminé de la dilution, goutte ou centimètre cube, suivant le besoin, ne contienne qu'une seule Bactérie. Si l'on veut examiner un liquide par exemple, une goutte prise avec une pipette

(1) Naegeli, Untersuchungen über niederen Pilze, 1878.
(2) Brefeld, Untersuchungen über die Spaltpilze, Bacillus subtilis. Berlin, 1878.
(3) Miquel, Les organismes vivants de l'atmosphère, Paris, 1882, et *Annuaire de l'Observ. de Montsouris*, 1881-1891.

stérilisée est mélangée à 50 ou 100 ou 500 centimètres cubes d'eau ou de bouillon stérilisés. On ensemence avec une goutte de la dilution une série de flacons, dont une partie doit rester stérile pour qu'on ait une certitude suffisante d'avoir poussé assez loin la dilution. Dans le cas contraire, il faut faire une seconde dilution avec une goutte de la première et arriver parfois jusqu'à une troisième. Cette méthode, qui exige une grande installation, puisqu'on est souvent obligé d'employer un nombre considérable de ballons, de cinquante à cent et plus, a donné d'excellents résultats entre les mains de Miquel, pour le dénombrement des Bactéries de l'air, des eaux ou des poussières. Elle a été aussi employée avec succès par Van Tieghem et Le Monnier (1) pour l'étude, en cultures cellulaires, de Champignons plus élevés.

On peut arriver à son but en faisant toute une série d'ensemencements successifs, sur les mêmes milieux ou sur des milieux différents. Après un certain nombre de cultures, une espèce prédomine souvent ; on peut facilement l'obtenir pure.

En inoculant sur une grande longueur une très faible quantité de matière à examiner sur un milieu solide, on obtient souvent le développement de colonies, bien isolées au début lorsqu'elles ne sont pas trop nombreuses et que la substance d'ensemencement était en très minime proportion. Il suffit d'ensemencer chacune d'elles séparément. C'est un procédé fort à recommander pour l'étude de liquides peu riches en Bactéries, sang ou pus par exemple. On trempe un fil de platine, le plus légèrement possible, dans le liquide à examiner, et l'on fait à son aide une ou plusieurs stries d'inoculation à la surface d'un tube de gélose ou d'un petit cristallisoir à couvercle contenant de la gélose. Il est bon de faire successivement plusieurs stries parallèles sans recharger l'aiguille. De cette façon, si la substance est très riche en Bactéries, il pourra n'en rester qu'un nombre très minime sur le fil de platine pour les derniers traits d'inoculation ; le premier ou les premiers ne donneront qu'un amas confus de colonies peu isolables, tandis qu'elles seront nettement séparées dans les derniers.

Pour isoler une espèce, on peut soumettre le mélange à des influences qui tuent les autres et auxquelles elle seule résiste. La *chaleur* est l'agent le plus employé. Pour isoler le *Vibrion septique*, Pasteur recommande (2) de traiter l'eau de lévigation des terres qui en contiennent par une température de 90° maintenue quelques minutes. La chaleur tue d'autres germes moins résistants et le liquide, injecté sous la peau d'un lapin, détermine les accidents typiques causés par le développement dans l'organisme de cette seule espèce. Miquel (3) a séparé le *Bacillus ureæ* du *Micrococcus ureæ* dans l'urine putréfiée et les eaux d'égout, en chauffant le liquide pendant deux heures de 80° à 90°. Le *Micrococcus ureæ* meurt à cette température que supporte très bien la première espèce ; le liquide ainsi traité, mis en culture, donne du *Bacillus ureæ* pur. On utilise du reste couramment cette méthode d'isolement pour obtenir le *Bacillus subtilis*. Les spores de cette espèce,

(1) Van Tieghem et Le Monnier, Recherches sur les Mucorinées (*Ann. des sc. nat.*, *Bot.*, 5e série, t. XVII, 1873).

(2) Pasteur, Sur le Vibrion septique (*Bull. de l'Acad. de méd.*, 1877).

(3) Miquel, Nouvelles recherches sur le Bacillus ferment de l'urée (*Bull. de la Soc. chim.*, XXXII, 1879, p. 126).

très répandues dans la nature et en particulier abondantes sur les herbes sèches, résistent longtemps à une chaleur de 100°, qui tue au contraire la plupart des espèces qui les accompagnent. En faisant bouillir pendant une demi-heure ou trois quarts d'heure une macération de foin, elles gardent seules toute leur vitalité et germent lors du refroidissement, tandis que les autres sont mortes. L'ébullition est en général un moyen excellent et très pratique pour isoler les espèces qui forment des spores de celles qui n'en produisent pas, ces corps reproducteurs résistant parfois à une température de 100° et plus.

On peut encore mettre en œuvre, pour isoler une espèce, la méthode dite *de culture élective* de Winogradsky (1). Pour ce savant, une culture est élective quand elle ne présente de conditions favorables qu'à la manifestation d'une seule fonction déterminée ou, plus exactement, d'une fonction aussi étroitement limitée que possible. Plus ces conditions seront étroites, exclusives en quelque sorte, plus l'espèce qui est douée de cette fonction sera favorisée aux dépens des autres qui auront la vie moins facile, pénible ou même impossible ; le microbe spécifique dominera. Il faut donc, pour arriver à l'isoler ainsi : 1° trouver un ensemble de conditions de culture appropriées ; ce sera la nature des fonctions connues ou supposées du microbe qui guidera dans la constitution et la disposition du milieu ; 2° bien saisir les caractères morphologiques du microbe prédominant pour ne pas les perdre de vue jusqu'à ce qu'on ait réussi à l'isoler et à l'obtenir en culture pure.

L'addition de substances antiseptiques peut donner de bons résultats. Les diverses espèces sont en effet loin de réagir d'une façon identique ; une dose, mortelle pour l'une d'elles, laisse encore le développement d'autres s'effectuer. La présence d'un peu d'acide phénique dans la gélatine, conseillée par Chantemesse et Widal, permet d'isoler plus facilement le *Bacille typhique* et le *Colibacille* des eaux contaminées, en empêchant le développement des colonies liquéfiantes qui détruisent trop souvent les cultures.

Cependant, la véritable méthode d'isolement des espèces est celle des cultures sur plaques, qui a été décrite précédemment avec détails (p. 281). La dilution des germes dans la masse de gélatine ou de gélose doit être suffisante pour que les colonies soient bien séparées les unes des autres. De cette façon, après avoir constaté les caractères particuliers des colonies de l'espèce que l'on veut isoler, au besoin à l'aide de la loupe ou du microscope, on en prélève une faible parcelle à l'aide d'une aiguille stérilisée et l'on ensemence avec elle les milieux que l'on juge convenables au développement de cette espèce. La technique de cette *prise de semence* a été indiquée précédemment (p. 311).

Les Bactéries anaérobies s'isolent par des procédés spéciaux qui ont été décrits en leur place (p. 293).

Certaines espèces pathogènes se séparent pour ainsi dire toutes seules dans l'organisme animal. Inoculées à des animaux dans un mélange, elles se développent plus rapidement ou plus abondamment que les autres qu'elles étouffent rapidement. L'organisme offre alors tous les caractères d'une culture pure ; il peut fournir de la semence absolu-

(1) Winogradsky, Recherches sur l'assimilation de l'azote libre de l'atmosphère par les microbes (*Arch. des sc. biol. de l'Inst. imp. de méd. de Saint-Pétersbourg*, III, 1834, n° 4).

ment pure pour les cultures. C'est ce qui s'observe pour le *Bacillus septicus*, le *Bacillus anthracis*, le *Bacillus tuberculosis*, le *Pneumocoque* entre autres.

Il est du reste un moyen très sûr et très pratique de s'assurer de la pureté d'une culture, moyen qui ne doit jamais être négligé, quand on peut l'employer, c'est la culture sur plaques. On arrive rapidement, en y procédant, à contrôler les expériences et à isoler l'espèce voulue, si d'autres s'y étaient accidentellement mélangées.

La contamination, assez fréquente encore dans les cultures les mieux conduites, provient de causes diverses qu'il est important de connaître pour pouvoir plus facilement les combattre. Les germes étrangers peuvent venir de l'air, du vase de culture, du milieu de culture, et de la substance d'inoculation.

L'air tient en suspension beaucoup de Bactéries, dont le nombre varie dans des proportions et suivant des causes que nous étudierons plus loin. Il peut s'en introduire quelques-unes pendant le cours des manipulations, en particulier dans le vase de culture, lorsqu'on l'ouvre pour l'ensemencer. Cette cause de contamination est loin d'avoir en réalité l'importance qu'on est porté à lui attribuer. Pasteur (1) avait déjà montré que l'air calme est peu riche en Bactéries ; Miquel (2) a établi, par des expériences précises, des moyennes très concluantes. D'après les recherches de ce savant observateur, la contamination des ballons de culture au bouillon de bœuf, ouverts le temps nécessaire pour l'inoculation, serait de 1 p. 200 à la caserne Lobau, en pleine agglomération, de 1 p. 500 à l'observatoire de Montsouris, et seulement de 1 p. 2 500 en plein air au parc Montsouris. De plus, Pasteur a depuis longtemps prouvé que, dans un air relativement calme, les Bactéries en suspension tombaient suivant la verticale et n'avaient jamais de tendance à remonter ; si bien que des ballons de bouillon stérilisé, mis en contact direct avec l'air au moyen d'un tube latéral recourbé vers le bas, peuvent se conserver indéfiniment sans présenter de développement de Bactéries dans leur intérieur. Ces résultats ont été confirmés par Hesse (3) dans une nombreuse série d'expériences instituées de la façon suivante : quatre tubes renfermant de la gélatine nutritive sont ainsi disposés et ouverts : le premier a son orifice tourné vers le haut, le second l'a dirigé vers le bas, un troisième est placé horizontalement et le quatrième obliquement l'orifice en haut. Sur ces quatre tubes laissés dans leur position un temps assez long, un seul est contaminé, le premier, celui qui a son orifice dirigé en haut. Lors donc que la chose est possible, dans les cultures sur milieux solides surtout, on devra, avant d'ouvrir un vase de culture, diriger son orifice vers le bas, ou même le tenir complètement renversé tout le temps nécessaire à l'opération qu'on exécute et le refermer dans cette position. Il faut en outre n'opérer que loin des courants d'air, dans un endroit où l'air est le moins possible chargé de poussières. On trouvera enfin grand avantage à empêcher la dissémination, dans le local occupé, des germes divers, Bactéries ou Moisissures,

(1) PASTEUR, Examen de la doctrine des générations spontanées (*Ann. des sc. nat., Zool.*, 1861).

(2) MIQUEL, *Annuaire de l'Observ. de Montsouris*, 1887.

(3) HESSE, Ueber quantitative Bestimmung der in Luft enthaltenen Microorganismen (*Mitth. aus dem kaiserl. Gesundheitsamte*, II, 1884, p. 187).

provenant des cultures abandonnées, qu'on doit détruire avec soin par la chaleur ou les antiseptiques ; c'est une petite précaution qui rend de très grands services.

Les vases, s'ils sont passés dans le stérilisateur à air chaud, comme nous l'avons indiqué, peuvent être considérés comme absolument purifiés. Il arrive trop souvent que des Moisissures de l'extérieur envahissent des cultures en végétant au travers des tampons d'ouate, ce qui survient surtout lorsqu'on coiffe les tubes de capuchons de caoutchouc. Il est alors prudent de faire tremper ces capuchons dans la solution de sublimé à 1 p. 1000 pendant quelques heures. On doit du reste vérifier de temps en temps l'état des bourres d'ouate et, dès qu'on y aperçoit des filaments mycéliens ou, à plus forte raison, des organes reproducteurs de Moisissures, chauffer jusqu'au roussi du coton la portion supérieure du tube, de manière à tuer ces ennemis des cultures. Quand, malgré toutes précautions, il s'en développe dans la culture, on peut encore quelquefois s'en débarrasser en chauffant à la flamme d'un bec de Bunsen la partie du vase où elles se trouvent, ou en essayant de détruire les îlots qu'elles forment avec une baguette de verre ou une tige de métal rougie au feu. Il est nécessaire, pour les éviter, de s'astreindre à *flamber la bourre chaque fois qu'on l'enlève* pour examiner la culture.

La pureté des milieux de culture est obtenue à l'aide des procédés de stérilisation décrits précédemment. Il est toujours bon de faire subir aux vases tout préparés une sorte d'épreuve préalable en les laissant, après leur stérilisation, à la température de l'étuve pendant quelques jours avant de les employer. Passé ce temps, s'il ne se produit aucun changement, ils peuvent être considérés comme bons, bien que certaines espèces semblent demander une plus longue préparation, un mois et plus d'après Miquel (1), pour commencer à croître, mais c'est l'exception. Certains liquides nutritifs cependant peuvent ne présenter aucun signe de putréfaction, bien que contenant des germes vivants et aptes à se développer. Cette *stérilisation apparente* provient de la non-appropriation du milieu à l'espèce, et s'observe lorsqu'on fait usage de milieux peu appropriés, les liqueurs minérales par exemple. En ajoutant en effet à des cultures de ces liquides, très claires et ne paraissant contenir aucun germe, une faible portion de bouillon de bœuf sûrement stérilisé, on peut voir le mélange se troubler rapidement, alors que les deux liquides, conservés séparément, seraient restés indéfiniment stériles.

Pour obtenir une culture pure, il faut enfin l'ensemencer à l'aide de substance qui ne contient que l'espèce voulue. Nous connaissons les conditions nécessaires pour obtenir ce résultat. Il peut cependant arriver qu'on obtienne des cultures pures tout en inoculant plusieurs espèces ; c'est quand l'une d'elles prend un développement tout à fait prédominant et fait disparaître ses voisines en les étouffant ou en rendant le milieu impropre à leur vie.

6. DÉVELOPPEMENT DES CULTURES ET MODIFICATIONS DES MILIEUX

La rapidité du développement, dans des conditions semblables de chaleur et d'aération, correspond toujours à la qualité nutritive du

(1) Miquel, Les organismes vivants de l'atmosphère. Thèse de Paris, 1882, p. 146.

milieu. Aussi est-il nécessaire, lorsqu'on veut établir des comparaisons, de ne se servir que de milieux de composition identique. Pour le *Spirille du choléra*, par exemple, suivant la puissance nutritive de la gélatine, les cultures présenteront un développement très variable ; telle culture de cinq ou six jours, sur gélatine peu nutritive, ne se montrera guère plus développée qu'une autre de deux jours sur gélatine très nutritive. Un liquide minéral n'offrira qu'un léger trouble après quelques jours d'ensemencement, alors que du bon bouillon de bœuf, mis en observation au même moment, sera devenu presque boueux.

Le développement des Bactéries dans les milieux nutritifs modifie, dans des limites assez larges, la composition et l'aspect de ceux-ci. Ce sont là des caractères de grande importance pour la diagnose des espèces.

Les caractères des cultures dans les milieux liquides, surtout dans le bouillon de bœuf qui peut être pris comme type, sont la plupart du temps, quoi qu'on en dise, très probants et très stables. Il faut cependant avouer que les véritables différences sont plus délicates à saisir, qu'il faut une habitude beaucoup plus grande pour les estimer, et enfin qu'il est plus difficile de s'apercevoir d'une contamination par des germes étrangers que dans le cas de cultures sur milieux solides.

Miquel (1) donne comme signes distinctifs les caractères généraux qui suivent :

1° Le liquide reste limpide, il se forme au fond du vase un dépôt qui peut être très léger, floconneux ; il peut être épais, caillebotté ; il peut être gluant, tenant à la paroi du vase. La couleur en est blanche, jaune, rouge, etc. ;

2° Le liquide se trouble d'abord, puis il se forme un dépôt au fond du vase, ou un voile à la surface du liquide.

Le trouble peut être très faible ou, au contraire, plus prononcé ; le liquide peut même devenir boueux.

Les éléments en suspension peuvent alors se déposer au fond du vase en un sédiment d'aspect variable, ou se réunir à la surface du liquide, pour y former un voile mince ou épais, uni ou ridé, sec ou visqueux.

La liqueur peut alors se clarifier ; elle conserve sa couleur primitive, se décolore, ou se teint en bleu, vert, etc. Elle peut devenir visqueuse, filante comme du blanc d'œuf ; dégager des odeurs ammoniacales, aigrelettes ou fétides ;

3° La liqueur reste transparente ; il se forme dans la masse des flocons blancs, légers, soyeux, semblables à des houppes de coton flottant dans le liquide, ou plus épais, caillebottés.

L'action de diverses espèces sur le lait a été étudiée par Duclaux (2) et Hueppe (3). Les caractères fournis sont très utiles. Le lait ne s'altère pas ou se coagule. Le coagulum forme une masse gélatineuse ou des grumeaux. Ce coagulum reste solide ou se dissout. La réaction est neutre, acide ou alcaline. Ces derniers caractères se perçoivent très nettement en additionnant le liquide, comme Duclaux l'a fait le premier, d'une petite quantité de teinture de tournesol ; on voit la coloration varier suivant le changement qui est produit.

Les cultures sur milieux solides fournissent des caractères macrosco-

(1) Miquel, Les organismes vivants de l'atmosphère, p. 186.
(2) Duclaux, Mémoire sur le lait, 1882, et Le lait, 1887.
(3) Hueppe, *Mitth. aus dem kaiserl. Gesundheitsamte*, II, 1884, p. 309.

piques généralement plus faciles à apprécier, et permettent d'isoler plus facilement les espèces. Voyons d'abord les cultures en tubes.

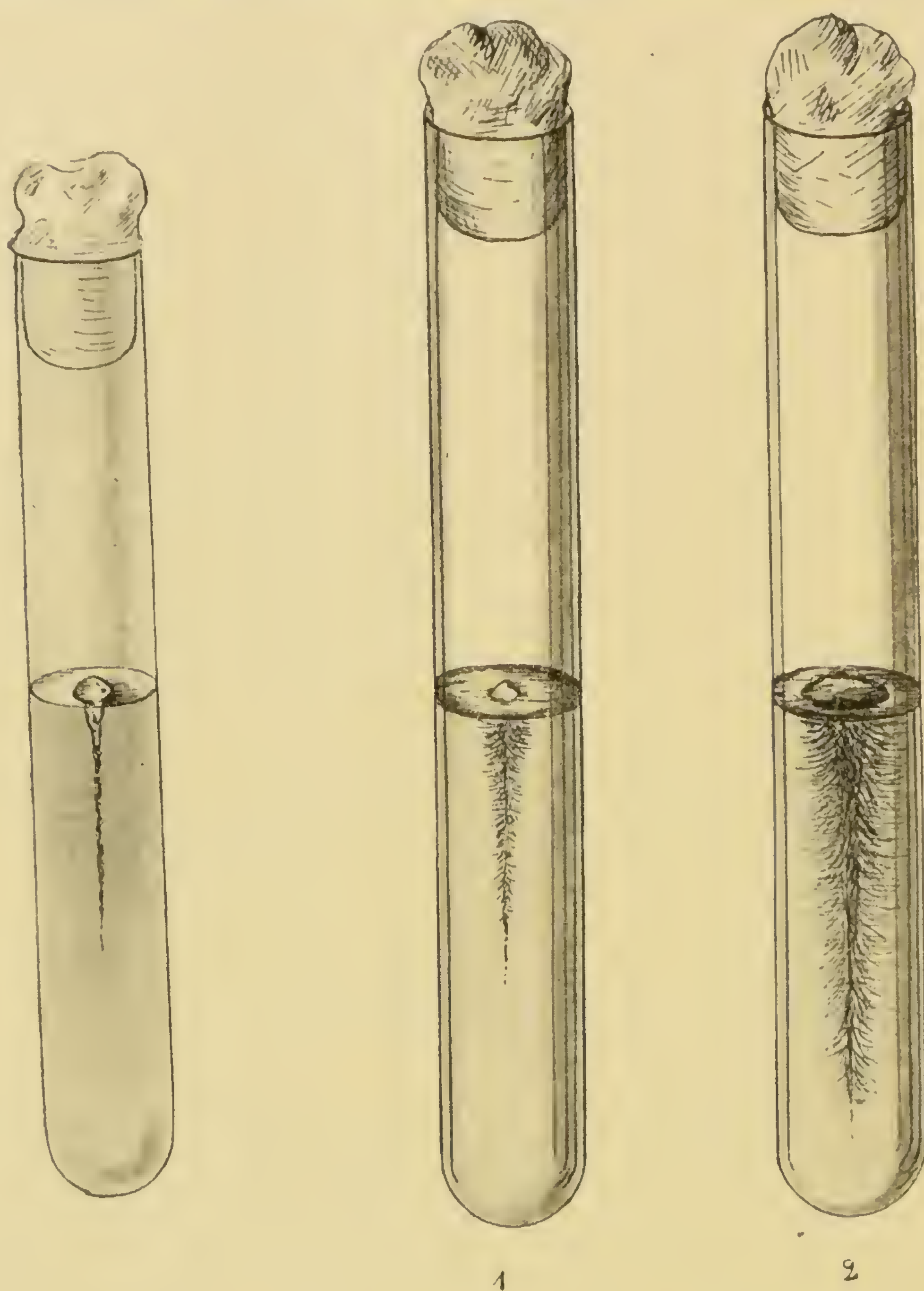


Fig. 162. — *Pneumobacille*, culture en clou.

Fig. 163 et 164. — Jeunes cultures de *Bacillus anthracis* avant liquéfaction de la gélatine.

La gélatine, dans une culture en piqûre, peut rester solide ou se liquéfier.

Dans le premier cas, la culture constitue une masse plus ou moins épaisse, homogène ou formée de petites sphères accolées les unes aux autres, qui emplit la piqûre et s'étale ou proémine plus ou moins à la surface en formant une sorte de *tête de clou* (fig. 162), ou un disque. Du canal de la piqûre peuvent partir de fins prolongements qui rayonnent en tous sens, de manière à figurer une houppe soyeuse plongée dans la gelée (fig. 163 et 164).

Si la gélatine doit se liquéfier, la liquéfaction commence à la surface à l'endroit de la piqûre, puis s'étend peu à peu dans tout le sillon tracé par l'aiguille. Elle est plus rapide en haut où l'oxygène est en abondance; il se produit alors une forme analogue à celle repré-

sentée figure 165 désignée sous le nom de *liquéfaction en entonnoir*. Le phénomène progresse, le diverticulum de gélatine liquéfiée devient plus considérable, et donne une sorte de sac creusé dans la gelée et plein de liquide (fig. 167). Enfin la liquéfaction a atteint les bords ; la gélatine se liquéfie entièrement ou dans une certaine profondeur seulement (fig. 166) lorsque l'espèce est avide d'oxygène et ne peut conséquemment se développer dans les couches profondes. Dans le liquide formé, la Bactérie se développe comme dans un bouillon ; elle peut se troubler uniformément, ou ne former qu'un dépôt à la partie inférieure.



Fig. 165. — Jeune culture de *Bacterium termo*.



Fig. 166. — Culture âgée de *Bacterium termo*.

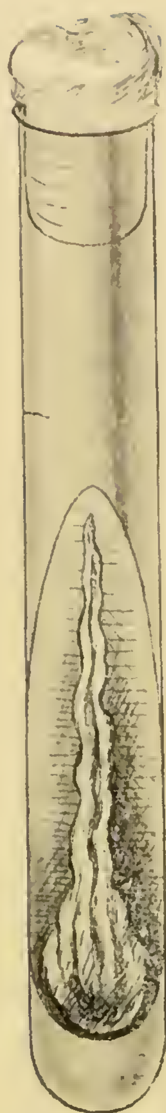


Fig. 167. — Culture du *Spirillum Finckleri*, âgée de deux jours.

La gélatine liquéfiée peut rester incolore ou se teindre de diverses nuances.

On n'inocule en strie sur gélatine, sur tubes inclinés, que les espèces qui ne liquéfient pas ce milieu. Il se forme le long de la strie un revêtement transparent ou opaque, incolore ou diversement coloré, tantôt très limité, tantôt recouvrant la plus grande partie de la surface inclinée. La gelée peut prendre des teintes variées, verte, rose, brune, suivant l'espèce que l'on cultive.

Les caractères des cultures en tubes sur gélose sont tout aussi variables. La culture s'étend plus ou moins de chaque côté de la strie; elle peut former à la surface un épais revêtement (fig. 168), uni ou plissé, diversement coloré. La Bactérie se développe dans la profondeur de la strie et envoie même parfois dans la gelée des prolongements rameux assez longs ou de grosses masses mamelonnées compactes. Il se condense souvent, à la partie inférieure du tube, une petite quantité d'eau, très utile pour maintenir une humidité constante dans l'appareil; la culture peut atteindre cette minime collection liquide et s'y développer. On peut alors observer côte à côte les parti-


Fig. 168. — Vieille culture de *Micrococcus pyogenes aureus*.

cularités du développement de l'espèce dans un liquide et sur un milieu solide.

Les cultures sur pomme de terre ont souvent aussi des aspects importants à connaître. Les espèces chromogènes y forment d'ordinaire d'épaisses membranes colorées de très vives nuances. D'autres donnent des membranes lisses ou plissées; d'autres, des revêtements épais et gluants. Certaines enfin, comme le *Bacille typhique*, le *Streptocoque pyogène*, se développent à la surface seulement en un enduit mince, brillant, parfois difficile à distinguer.

La forme et l'aspect des cultures que donne chaque espèce sur les différents milieux seront décrits avec soin dans la troisième partie de ce livre.

Les différents procédés de culture cités ne sont pas applicables à toutes les espèces. Certaines ont des besoins spéciaux qui font que, pour des raisons inconnues, un milieu donné, très bon pour beaucoup d'autres, ne permet pas leur développement. Il est quelques espèces qui ne se développent pas sur la gélatine ; c'est même là une des grandes objections que l'on fait à la méthode des cultures sur plaques. Par contre, je connais une espèce de l'eau, très voisine du *Bacille typhique* comme aspect et forme des colonies sur plaques, qui ne se développe pas du tout dans le bouillon et perd, après une culture, la propriété de croître sur gélatine. La conséquence à tirer est qu'il faut toujours cultiver une espèce à étudier sur des milieux divers pour constater le plus qu'on peut de caractères distinctifs.

7. PROCÉDÉS D'ÉTUDE DES PRODUITS FORMÉS DANS LES CULTURES

L'importance des substances produites dans les divers milieux nutritifs par la vie des microbes a été proclamée par Pasteur tout au début de ses recherches ; il faisait de ces fonctions physiologiques un caractère de tout premier rang dont on devait amplement tenir compte dans l'établissement de l'espèce ou, tout au moins, du type. On a grande tendance aujourd'hui à se ranger, en bonne partie, à cette opinion, que les recherches de morphologie avaient, pour un moment, éclipsée ou tenue dans l'ombre. On avait cependant toujours reconnu la valeur de certains des composés formés dans ces conditions. La production d'acide acétique, d'acide butyrique, d'ammoniaque, de différents gaz, de matières colorantes, figurait, souvent au premier rang, dans les diagnoses d'espèces. Pour reconnaître la présence de ces corps, il n'y a qu'à appliquer d'ordinaire les méthodes chimiques habituelles ; il est bon, toutefois, pour quelques-uns d'entre eux dont la recherche est fréquente, d'indiquer la manière de faire la plus pratique.

On sait aujourd'hui qu'en première ligne des substances issues de la vie microbienne, comme intérêt, se placent les composés que nous avons vus réunis sous le nom général de *produits solubles*. A cause

de l'importance toute particulière qu'on leur attribue, il est nécessaire au bactériologiste de pouvoir en reconnaître la présence dans les milieux où ils ont pu se former et même de chercher à les isoler. Ces produits, souvent très actifs, se rangent en deux catégories. Les uns sont des produits alcaloïdiques, véritables bases formant avec les acides de vrais sels souvent cristallisés, les *ptomaïnes*; les autres, les *toxines* ou *toxalbumines*, sont des substances amorphes, se rapprochant par leurs propriétés des diastases, peut-être parfois des albumines solubles, souvent des substances colloïdales. Chacune de ces catégories demande des procédés d'extraction spéciaux; elles se distinguent surtout, à ce point de vue, en ce que les produits de la seconde sont précipitables par l'alcool, qui dissout le plus souvent les ptomaïnes; les dernières doivent donc être recherchées dans le liquide alcoolique, les premières dans le précipité.

Il sera intéressant de rechercher, dans les cultures, les albumoses, les peptones, la mucine, les matières colorantes; certains gaz, l'hydrogène sulfuré, que produisent un assez grand nombre d'espèces en réduisant le soufre surtout contenu dans les composés albuminoïdes; l'ammoniaque, les nitrates et les nitrites, qui proviennent de différents stades de transformation de la matière azotée; certaines amines, la triméthylamine particulièrement; la leucine et la tyrosine, pouvant indiquer l'action de ferments diastasiques particuliers; les acides organiques; les alcools, particulièrement l'alcool éthylique; les aldéhydes, les mercaptans, le tryptophane, l'indol, le phénol, le scatol.

On peut, pour ces recherches, user de cultures complètes, comprenant les microbes tués par les réactifs ou la chaleur; ou seulement des cultures privées de microbes par la filtration sur papier ou, mieux, sur bougie Chamberland, comme il a été indiqué page 262.

Recherche des ptomaïnes.

Une première méthode très simple, qui n'est guère applicable qu'aux bouillons bien filtrés, consiste à alcaliniser le liquide avec de la potasse pour mettre en liberté les bases organiques et à l'épuiser par l'éther : par évaporation, on obtient un résidu sirupeux, impur, contenant la ptomaïne ou les ptomaïnes. On peut le purifier en traitant par l'acide chlorhydrique et en faisant cristalliser les chlorhydrates à plusieurs reprises. Le chlorhydrate dissous dans de l'eau alcalinisée cède à l'éther sa base devenue libre. C'est là un procédé imparfait à plusieurs points de vue, mais qu'il peut être bon d'employer, surtout lorsqu'on ne cherche que des indications générales, à cause de sa simplicité et de sa facilité d'exécution.

Le procédé le plus recommandable pour l'extraction des ptomaïnes est celui indiqué par Armand Gautier (1). Si l'on a affaire à des produits solides, on les broie et on les épuise à l'eau bouillante; le liquide est filtré. Si l'on opère sur des bouillons, on les soumet à l'ébullition, puis on les filtre. Dans les deux cas, l'intervention de la chaleur sert à chasser l'ammoniaque libre. Le liquide est précipité par l'acétate de plomb. On filtre et l'on ajoute au filtratum un léger excès d'acide

(1) Armand Gautier, Cours de chimie, t. III. — Chimie biologique, p. 262. — Les toxines microbiennes et animales, 1896. Paris, Société d'éditions scientifiques.

oxalique qui acidifie la liqueur et précipite l'excès de plomb. On filtre encore et évapore pour chasser les acides gras, en ajoutant de temps à autre un peu d'acide oxalique si l'odeur d'acide acétique ou butyrique se manifeste. On traite alors la liqueur par un lait de chaux très clair, de façon à enlever la majeure partie, mais non la totalité, de l'acide oxalique libre; enfin on concentre, s'il le faut, dans le vide, à l'état de sirop épais; celui-ci est repris par l'alcool à 98°, qui dissout les oxalates des bases. L'alcool est évaporé et l'extrait sirupeux, délayé dans un peu d'eau, est broyé avec son poids d'un mélange de deux parties de craie et d'une partie de chaux éteinte en poudre. On chauffe à 35° ou 40° tant qu'il se dégage l'odeur d'ammoniaque et en recueillant, s'il le faut, les alcaloïdes volatils, puis on épuise par l'alcool à 83° bouillant, qui dissout les alcaloïdes. On précipite du liquide une trace de chaux par l'acide oxalique, on sature l'alcool par l'acide chlorhydrique et l'on évapore dans le vide sur la chaux éteinte. On obtient ainsi les chlorhydrates des bases cherchées.

Pour séparer les ptomaïnes qui peuvent être à plusieurs dans le résidu, on utilise la propriété qu'ont certaines de précipiter par le chlorure mercurique, d'autres de donner des chloro-platinates et chloraurates peu solubles ou insolubles et cristallisables, de distiller en présence de magnésie pour les ptomaïnes volatiles.

Le résidu calcaire d'où l'alcool à 83° a extrait des bases libres peut en contenir de non solubilisées. On l'acidule faiblement d'acide oxalique et on le reprend par l'eau bouillante. On neutralise par quelques gouttes d'eau de chaux, on filtre et l'on évapore; les bases peu solubles dans l'alcool restent comme résidu.

Les ptomaïnes se présentent généralement sous la forme de liquides huileux; quelques-unes sont solides. Elles s'unissent aux acides en donnant des sels cristallisables. Elles précipitent par l'acide picrique et les réactifs généraux des alcaloïdes. La plupart se dissolvent bien dans l'eau, médiocrement dans l'alcool, mal dans la benzine et le chloroforme. Les résidus salins desséchés des ptomaïnes sont colorés en violet fugace par l'acide sulfoséléniteux, et en bleu pur, virant au vert bleu, par l'acide sulfomolybdique (Garnier et Schlagdenhaufen). Les ptomaïnes ont souvent sur l'économie des effets toxiques bien marqués, variables toutefois d'une ptomaïne à une autre. On en connaît un assez grand nombre; quelques détails seront donnés en étudiant les espèces bactériennes intéressantes à ce point de vue.

Recherche des toxines.

Autant que possible, les cultures sur lesquelles on veut opérer doivent être faites sur un milieu dépourvu de matières albuminoïdes ou de peptones, pour éviter la présence de substances protéiques difficiles à séparer des toxines. C'est ici que les milieux minéraux peuvent rendre beaucoup de services; malheureusement, beaucoup d'espèces, des pathogènes surtout, n'y végètent pas bien.

Les liquides de culture, filtrés sur bougies Chamberland, sont traités par un grand excès d'alcool à 95°, de quinze à vingt fois leur volume. On laisse en contact douze à quinze jours à l'obscurité; on filtre pour séparer les substances albuminoïdes insolubilisées. Avant de traiter par l'al-

cool, il y a intérêt, pour raison d'économie, à évaporer le liquide dans le vide à 30°; on use ainsi beaucoup moins d'alcool. On dessèche le résidu dans le vide en présence d'acide sulfurique; on le pulvérise finement et l'on épuise par l'eau distillée froide; la toxalbumine se dissout dans l'eau. On peut la précipiter par l'alcool de sa solution. Comme ces précipitations affaiblissent toujours l'activité de telles substances, il vaut mieux faire les essais physiologiques avec la solution aqueuse obtenue comme il a été indiqué ci-dessus.

Ces toxines, telles qu'on les connaît actuellement, bien imparfaitement encore, il faut le reconnaître (Voy. p. 64), sont des corps amorphes, blancs ou jaunâtres, sans odeur ni saveur, très solubles dans l'eau d'où les entraînent cependant les précipités gélatineux d'alumine et de phosphate de chaux, insolubles dans l'alcool fort, l'éther, le chloroforme, sans odeur ni saveur. En présence de l'eau, elles s'altèrent lorsqu'on les chauffe vers 65°; à sec, elles supportent mieux la chaleur.

L'inoculation aux animaux des produits de culture débarrassés de microbes peut aussi renseigner sur la présence de produits actifs.

L'inoculation à un cobaye tuberculeux peut faire reconnaître la présence de tuberculine dans un liquide pathologique où l'examen microscopique ne révèle pas la présence de Bacilles tuberculeux.

Les *antitoxines* se rapprochent des toxines au point de vue chimique.

C'est par la méthode qui vient d'être décrite que Guérin et Macé (1) ont pu extraire une substance antitoxique du sérum de cheval immunisé à l'égard de la diphtérie.

Recherche des albumoses et des peptones.

Ces produits résultent de la modification des matières albuminoïdes proprement dites ou de dérivés secondaires comme la gélatine, par beaucoup d'espèces microbiennes.

Les albumoses ne précipitent pas par la chaleur. Elles sont précipitables par addition à saturation de sels divers, en particulier le chlorure de sodium, le sulfate de magnésie, le sulfate d'ammoniaque. Elles précipitent à froid par l'acide nitrique, l'acide acétique, le mélange de cyanure jaune et d'acide acétique; le précipité se redissout à chaud et reparaît par refroidissement. Elles donnent la réaction rose du biuret; le réactif de Millon les colore en rouge vif.

Les peptones ne précipitent pas par la chaleur. Elles ne précipitent ni par l'addition de sels solubles en excès, ni par l'acide azotique, l'acide acétique, le cyanure jaune acétiques. Elles donnent la réaction du biuret (coloration rouge lorsqu'on les additionne d'un excès d'alcali, puis d'un peu de sulfate de cuivre).

Recherche de la mucine.

Beaucoup d'espèces en produisent (2). Weyl (3) en a signalé chez le

(1) Guérin et Macé, Sur l'antitoxine diphtérique (*C. R. de l'Acad. des sc.*, 5 août 1895).

(2) Rettger, Mucin as a bacterial product (*Journ. of med. Research*, 1903, X, p. 101).

(3) Weyl, Zur Chemie und Toxikologie des Tuberkelbacillus (*Deutsche med. Wochenschr.*, 1891, n° 7).

Bacille tuberculeux, Lepierre (1) chez un *Bacille fluorescent*, Charrin et Desgrez (2) chez le *Bacille pyocyanique*.

La mucine n'est pas coagulée par l'ébullition. Elle précipite par tous les acides; le coagulum gluant se redissout dans un excès d'acide minéral, mais non d'acide organique. Les sels neutres la précipitent. Elle se colore en rouge violacé ou jaunâtre par le réactif de Millon.

Recherche des matières colorantes.

Il n'est pas possible de donner de méthode générale de recherche. Suivant la nature et la solubilité du pigment, on emploie l'un ou l'autre des dissolvants indiqués précédemment (p. 170). Pour être certain d'opérer sur un produit pur, il serait nécessaire de l'avoir cristallisé ; on n'obtient que très rarement ce résultat avec les pigments microbiens, et encore peut-on avoir affaire à des produits cristallisés de nature diverse, tyrosine, sels organiques ou minéraux, imprégnés seulement de la véritable matière colorante.

Le spectroscope rend ici de véritables services; mais ces recherches d'analyse spectrale sont encore trop peu avancées pour qu'on puisse en tirer quelques indications générales.

Recherche des gaz.

Il est utile d'employer ici des dispositifs spéciaux de culture qui permettent de recueillir facilement les gaz produits d'habitude en petites

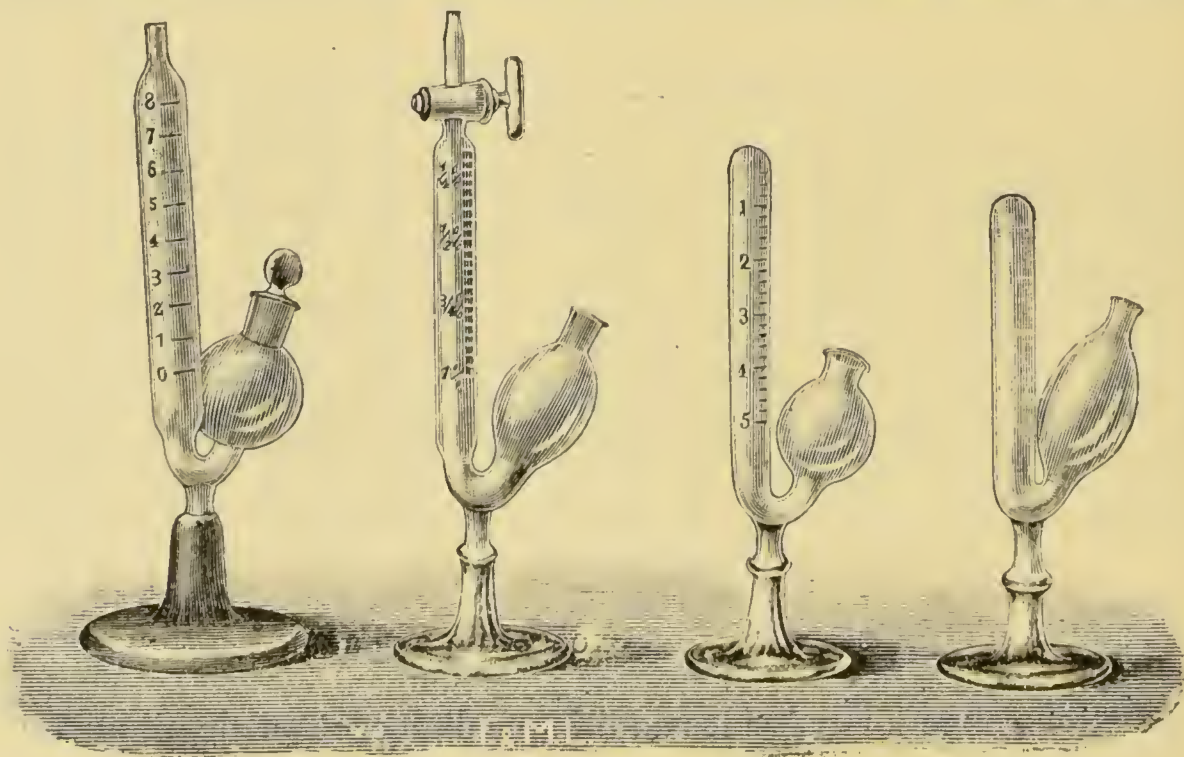


Fig. 169. — Tubes de fermentation d'Einhorn.

quantités, tout en agissant sur peu de milieu. Les vases de cultures représentés figure 169 permettent de le faire commodément. Le liquide de culture est disposé de façon à remplir complètement la branche montante; le gaz qui se dégage se ramasse au haut de cette branche,

(1) Lepierre, Production de mucine par les Bactéries (*Soc. de Biol.*, 1898, p. 284).

(2) Charrin et Desgrez, Production d'une substance mucinoïde par les Bactéries (*Soc. de Biol.*, 1898, p. 209).

où sa quantité peut être évaluée et d'où il peut être soutiré avec les deux premiers appareils. Les procédés ordinaires d'analyse renseignent sur la nature du produit.

L'*azote* est dégagé en grande quantité de l'azotate de potasse par le *Bacille pyocyanique*.

De l'*oxygène* peut être dégagé par des espèces aérobies cultivées à l'abri de l'air.

Du *méthane* est produit surtout dans les fermentations des produits végétaux, surtout des celluloses.

L'*hydrogène* doit être fréquent, surtout dans les fermentations par réduction. C'est l'hydrogène à l'état naissant qui réagit secondairement sur le soufre du milieu pour donner de l'hydrogène sulfuré.

Recherche de l'hydrogène sulfuré.

Il est très fréquent dans les produits de la vie microbienne. On peut le reconnaître simplement à l'odeur. Il vaut mieux recourir aux réactifs chimiques; le meilleur est l'acétate de plomb (1). On place dans le col du vase de culture une bande de papier à l'acétate de plomb et l'on ferme avec un bouchon de liège ou une feuille d'étain, mais pas de caoutchouc qui renferme souvent du soufre. Au contact de l'acide sulfhydrique et suivant sa proportion, le papier brunit plus ou moins ou peut même devenir noir; lorsqu'il ne s'en forme que des traces, la réaction demande du temps pour apparaître. Une dissolution alcaline d'oxyde de plomb dans la potasse donne un papier plus sensible que l'acétate.

D'après Morris (2), il est préférable d'user de milieux de culture additionnés de petites quantités d'acétate de plomb, où les Bactéries croissent aussi bien que dans les milieux normaux. Le meilleur est la gélose peptonisée à laquelle on ajoute, avant stérilisation, 1 gramme d'acétate de plomb par litre; la gélatine réussit moins bien; le bouillon ne convient pas, tout le plomb s'y précipite. Le milieu brunit ou noircit plus ou moins vite, en commençant par la surface.

Toutefois, avant la mise en culture du microbe, les milieux doivent être essayés avec l'acétate de plomb, pour s'assurer qu'ils ne renferment pas de composés sulfurés pouvant réagir.

Espèces produisant de l'hydrogène sulfuré.

Bacille typhique	En un jour.
Spirille du choléra	—
Bacille du rhinosclérome	—
Staphylocoque pyogène doré	—
Proteus vulgaris	—
Colibacille	En deux jours.
Bacille de la morve (réaction inconstante)	—
Proteus mirabilis	—
Bacille fluorescent non liquéfiant	—
Vibrion de Metschnikoff	—

(1) Petri et Maassen, Beiträge zur Biologie der Krankheitserregenden Bakterien im besondere über die Bildung von Schwefelwasserstoff durch dieselben unter vornehmlicher Berücksichtigung des Schweiner-rothlaufs (*Arb. aus dem kaiserl. Gesundheitsamte*, VIII, 1893, p. 318).

(2) Morris, Studien über die Produktion von Schwefelwasserstoff, Indol und Merkaptan bei Bakterien (*Arch. für Hygiene*, XXX, 1897, p. 304).

Bacille du Schweinseuche	En deux jours.
Bacillus megaterium	—
Bacille pyocyanique	En trois jours.
Vibrio aquatilis de Günther	—
Vibrion de Dunbar	—
Bacille de la Swine-plague	En quatre jours.
Bacillus typhi murium	—
— *capsulatus* de Pfeiffer	—
Vibrion de Deneeke	—
Bacillus Zopfii	En six jours.
Actinomyces	En huit jours.
Spirille de Finckler	En neuf jours.
Bacille fluorescent liquéfiant	En dix jours.
— du choléra des poules	En douze jours.
Vibrion de Weibel	En seize jours.
Spirillum concentricum	En dix-sept jours.
Bacille du lait bleu (faiblement)	En trente jours.
Bacillus prodigiosus (faiblement)	—
Bacille rouge de Globig (faiblement)	—

Les espèces suivantes en donnent aussi après une durée variable :

Bacillus actinobacter.
— *anthracis.*
— *cavicida.*
— *diphteriæ.*
— *fluorescens non liquefaciens.*
— *Friedlaenderi* (traces).
— *lactis aerogenes.*
— *mesentericus vulgatus* (traces).
— *pseudobutyricus* (Hueppe).
— *pseudodiphtericus.*
Bacille rouge de Kiel.
— du rouget du porc (réaction inconstante).
Bacillus subtilis (traces).
— *suipestifer.*
— *suisepticus.*
— *sulfureus* (Holzchenikoff).
Micrococcus pyogenes (traces).
Sarcina lutea (traces).
Tyrothrix urocephalum.

Ces résultats peuvent naturellement varier suivant certaines conditions du milieu. C'est la raison pour laquelle Petri et Maassen ont parfois énoncé des résultats différents.

Recherche de l'ammoniaque.

Beaucoup d'espèces en donnent (1). On peut la reconnaître à l'odeur, à l'emploi du papier de tournesol ou de curcuma humides, ou user de sa propriété de donner des vapeurs blanches avec une baguette de verre imprégnée d'acide acétique cristallisable. Les amines réagissent de même. Il vaut mieux se servir du *réactif de Nessler* qui donne, avec les milieux contenant de l'ammoniaque, une coloration allant du jaune au brun rouge suivant la proportion ; il est alors nécessaire d'agir sur des milieux incolores, comme les milieux minéraux.

Pour doser l'ammoniaque, on distille sur de la magnésie et on évalue

(1) Berghaus, Ueber die Ammoniakbildung bei einigen Bakterienarten (*Arch. für Hygiene*, LXIV, 1907, p. 1).

la quantité qui a passé dans le distillat avec une solution titrée d'acide sulfurique.

Recherche des nitrites.

On les recherche dans des milieux additionnés préalablement d'un peu de nitrate de potasse; les cultures doivent rester quelques jours à l'étuve. On peut employer l'empois d'amidon très faible additionné de 0gr,5 p. 100 d'iodure de potassium et quelques gouttes d'acide sulfurique ; s'il y a des nitrites, il se produit une coloration bleu noir ou violacée. La réaction de la métaphénylènediamine est plus sensible; on ajoute un peu de solution du produit et quelques gouttes d'acide sulfurique étendu : s'il y a des nitrites, on observe une coloration brun jaune.

Le procédé de Pichard est extrêmement sensible ; une goutte de solution de nitrite est mélangée sur une assiette blanche avec une goutte d'acide chlorhydrique pur, puis on ajoute un fragment de brucine ; après cinq minutes au plus on obtient une coloration allant du rouge-vermillon au jaune clair. Dans les mêmes conditions, l'acide chlorhydrique ne donne rien avec les nitrates.

Le procédé de Schuyten (1), bien moins sensible que le précédent, peut également être employé : mélanger 5 centimètres cubes d'une solution à 1 p. 100 d'antipyrine dans de l'acide acétique dilué à 10 p. 100 à un égal volume de liquide à examiner ; s'il renferme des nitrites, il se produit une coloration verte dans l'espace d'une minute.

Recherche de la triméthylamine.

Le réactif de Nessler donne, surtout lorsqu'il y a un excès d'amine, un précipité blanc brunissant assez rapidement. Le papier rouge de tournesol et celui de curcuma humides se comportent comme avec l'ammoniaque.

Pour les amines, on peut employer la réaction d'Hoffmann avec le chloroforme et l'alcool sodé.

Recherche de la leucine et de la tyrosine.

La leucine se reconnaît, à l'examen microscopique, à ses sphéro-cristaux ou aux masses globulaires caractéristiques.

Pour rechercher la tyrosine, le dépôt est traité, sous la lamelle, au microscope par un peu d'acide chlorhydrique concentré ; la tyrosine se dispose en aiguilles groupées en faisceaux ou en étoiles dont l'aspect est caractéristique. On peut aussi employer la tyrosinase, qui donne la coloration brune spéciale.

Recherche des acides organiques.

Tous sont solubles dans l'éther. Acidifier le liquide avec de l'acide

(1) Schuyten, *Chem. Zeit.*, 1896, p. 722.

sulfurique pur, et agiter avec plusieurs volumes d'éther pur. L'éther, décanté et filtré, est évaporé à l'air après addition de quelques gouttes d'eau. Après essai au perchlorure de fer, on transforme en sels de zinc, plomb ou chaux, et l'on suit les méthodes d'analyse ordinaire.

L'acide butyrique se reconnaît en ajoutant quelques gouttes d'alcool éthylique, un peu d'acide sulfurique et chauffant ; il se produit de l'éther butyrique à odeur de fraises. On peut caractériser l'acide lactique par son sel de zinc et la réaction d'Uffelmann.

L'acidité totale est évaluée avec une solution titrée de potasse et la phénolphtaléine comme indicateur.

Recherche de l'alcool et de l'aldéhyde.

C'est surtout l'alcool éthylique que l'on peut avoir en vue. On fait une distillation préalable. Le distillat, additionné d'une solution aqueuse d'iode à 10 p. 100 avec quantité suffisante d'iodure de potassium, et d'un excès de lessive de soude, donne, après quelques instants, un précipité jaune clair, formé de cristaux étoilés hexagonaux d'iodoforme, à odeur bien spéciale.

L'aldéhyde et l'acétone donnent cette même réaction, mais instantanément.

Pour déceler l'aldéhyde, on emploie une solution aqueuse de fuchsine décolorée par l'anhydride sulfureux. On agite parties égales de solution et de liquide à examiner ; s'il y a de l'aldéhyde, on observe une coloration rouge.

Recherche des mercaptans.

On traite par un peu d'éther, qui est décanté, puis évaporé. Les mercaptans se reconnaissent à leur odeur alliacée spéciale et à la couleur des précipités qu'ils forment avec les sels métalliques.

On dissout une petite quantité d'isatine dans de l'acide sulfurique concentré ; en y faisant passer du mercaptan gazeux, la solution se colore en vert-pré (1).

Recherche du tryptophane.

On emploie la *Tryptophane-reaktion*. En ajoutant de l'eau chlorée ou de l'eau bromée, il se produit une coloration rouge violet. Ou encore, la solution, chauffée avec de l'acide chlorhydrique et un peu de saccharose, prend une coloration rouge violet. L'alcool amylique s'empare de la couleur.

Beaucoup de Bactéries donnent de l'indol et du scatol aux dépens du tryptophane.

Recherche de l'indol.

La réaction de l'indol, positive ou négative, est un caractère couramment utilisé (2). La présence de l'indol peut servir à la diagnose d'espèces difficiles à distinguer. Voy., pour sa production, p. 69.

(1) Bauer, *Zeitschrift für physiologische Chemie*, 1902, XXXV, p. 346.
(2) Porcher, Des corps indologènes de l'urine (*C. R. de l'Acad. des sc.*, 3 mai 1909).

L'indol ne se produisant que par l'attaque d'une matière albuminoïde contenant du tryptophane dans sa molécule, il est nécessaire d'user de telles substances pour le rechercher.

C'est le cas des peptones et surtout des peptones pancréatiques. La gélatine n'en donne pas, si on ne l'a pas additionnée de peptones. D'un autre côté, il est des peptones qui contiennent de l'indol ; il est avant tout nécessaire de vérifier à ce point de vue celle que l'on emploie.

Il faut éviter, dans les milieux, la présence de sucres qui nuit à la formation de l'indol et peut même l'empêcher complètement ; les peptones sont aussi à vérifier de ce côté.

L'indol se formant lentement et progressivement, il est mieux de le rechercher dans des cultures un peu âgées, de quatre à huit jours, par exemple ; on peut cependant déjà en reconnaître la présence en moins de vingt-quatre heures, même après quinze heures dans bien des cas, après seulement six à huit heures avec les réactions les plus sensibles.

Les meilleurs milieux pour ces recherches sont d'abord les simples solutions de peptones, puis les bouillons peptonisés. Employez de préférence les peptones Witte, Chapoteaut, Collas. Le taux des peptones importe beaucoup, celui de 5 p. 100 donne de meilleurs résultats que celui de 2 p. 100. Il est des espèces qui n'en montrent de petites quantités qu'avec un taux de 5 à 10 p. 100, et même seulement après un long temps de culture, une quinzaine de jours.

On peut rechercher l'indol simplement dans les bouillons de culture mêmes, soit bouillons ordinaires, soit bouillons phéniqués ou acidifiés que l'on emploie pour l'isolement de certaines espèces. La présence de l'acide ne nuit pas ; loin de là, les réactions d'indol ne réussissent pas en milieux alcalins.

La réaction est rendue plus sensible en soumettant à la distillation le bouillon de culture pour que l'indol, volatil, passe dans le distillat ; on opère alors sur une solution plus concentrée. L'opération peut se faire en petit, sur 10 à 20 centimètres cubes de culture, en recueillant alors de 2 à 5 centimètres cubes de liquide. On a des résultats bien meilleurs en employant une quantité plus grande de culture, comme il va être dit. On prend 400 centimètres cubes de bouillon de culture que l'on additionne de quantité égale d'eau distillée et de 5 centimètres cubes d'acide sulfurique ordinaire. On distille jusqu'à ce que l'on obtienne 600 à 700 centimètres cubes. Ce distillat est alcalinisé avec de la potasse, puis redistillé jusqu'à obtention de 500 centimètres cubes environ. Dans ce distillat se trouvent l'indol et le scatol. Le résidu est saturé par un courant d'acide carbonique, puis distillé à nouveau presque jusqu'à siccité ; ce dernier distillat renferme les phénols.

Les réactions qui décèlent la présence de l'indol sont toutes des réactions de coloration.

Réaction indol-nitreuse.

Elle est basée sur la propriété, signalée par Salkowsky (1), qu'a l'indol, dissous dans l'eau, de donner une coloration rouge-sang, rouge

(1) Salkowsky, *Zeitschrift für physiologische Chemie*, 1888, VIII, p. 417.

vineux ou simplement rosée, en présence de l'acide nitreux. Kitasato (1) a le premier cherché à faire de cette réaction un caractère pouvant servir à la diagnose. La manière de faire est la suivante :

A 10 ou 20 centimètres cubes environ de bouillon de culture que l'on veut essayer, on ajoute 1 ou 2 centimètres cubes d'une solution de nitrite de potassium, à 1 gramme pour 1 000 grammes d'eau, puis on traite par quelques gouttes, 8 à 10, d'acide sulfurique pur. S'il y a de l'indol, la coloration apparaît. On peut employer l'acide chlorhydrique au lieu d'acide sulfurique.

La coloration peut être très légère et alors masquée plus ou moins complètement par la nuance du bouillon. En ajoutant 1 ou 2 centimètres cubes d'alcool amylique pur et en remuant doucement pour ne pas faire d'émulsion, on provoque la concentration de la matière rouge dans l'alcool amylique qui se teint alors en rose plus ou moins foncé. Il est bon d'essayer d'avance l'alcool amylique que l'on emploie, les alcools amyliques ordinaires renfermant souvent eux-mêmes de notables proportions d'indol; il ne faut employer que des alcools purs, rectifiés suffisamment pour ne pas donner à eux seuls la réaction cherchée. Cet emploi d'alcool amylique rend la réaction beaucoup plus nette et est toujours à utiliser quand la coloration n'est pas évidente. Parfois, lorsqu'il n'existe que très peu d'indol, la coloration ne devient bien manifeste qu'au bout d'un certain temps, quelques heures. On dirait presque que l'alcool a dissous un corps indologène qui ne donne de l'indol qu'après quelque temps, au contact de l'air.

Grubss et Francis (2) recommandent comme très sensible la manière de faire suivante :

A 7 centimètres cubes d'une culture de trente-quatre heures, on ajoute 8 à 10 gouttes d'acide sulfurique pur et l'on agite; on fait couler très doucement le long de la paroi inférieure du tube incliné 3 ou 4 centimètres cubes d'une solution de nitrite de sodium à 1 p. 1000, de façon à ne pas mélanger les deux liquides. Lorsqu'il existe de l'indol, il se forme, à la surface de séparation, une coloration très visible. Il devient possible, dans ces conditions, de reconnaître la présence d'indol dans des cultures où l'on n'en avait jamais observé la réaction.

On peut aussi recourir à la modification indiquée par Nencki. On acidule le liquide avec quelques gouttes d'acide acétique cristallisable, puis on ajoute 3 à 4 centimètres cubes d'un mélange d'alcool et d'éther; après agitation, on recueille l'éther qu'on évapore dans une petite capsule en porcelaine, sur le résidu on dépose quelques gouttes de la solution de nitrite de potassium et très peu d'acide sulfurique pur. On parvient ainsi à révéler des traces d'indol qui échapperaient avec le procédé primitif.

Nonotte et Demanche (3) recommandent de chauffer jusqu'à l'ébullition la partie supérieure du liquide, après addition de la solution de nitrite et de l'acide; la coloration rose est beaucoup plus nette. Ils ont ainsi pu déceler l'indol dans une culture de *Colibacille* dès la qua-

(1) Kitasato, *Zeitschrift für Hygiene*, VII, 1889, p. 515.
(2) Grubss et Francis, Ringtest for indol (*Bull. of the hygienic laboratory*. Washington, mai 1902).
(3) Nonotte et Demanche, Sur la recherche de l'indol dans les cultures microbiennes (*C. R. de la Soc. de Biol.*, LXIV, 1908, p. 494 et 658).

trième heure, alors que la réaction n'apparaissait à froid que vers la vingtième.

Avec des cultures de Bactéries qui forment des nitrites aux dépens de la petite quantité de nitrates, qui se rencontrent toujours dans les milieux complexes employés, la réaction se produit par simple addition d'acide. Le *Spirille du choléra* la présente bien nette, dans ces conditions, ainsi que quelques espèces voisines; d'où le nom de *réaction du rouge de choléra* qui lui a été donné. Pour en tirer parti, dans ce cas, il faut employer de l'acide sulfurique bien exempt de produits nitreux ou, mieux, de l'acide chlorhydrique ou de l'acide oxalique purs, que l'on peut avoir plus facilement tout à fait privés de produits nitreux.

Réaction de Legal-Weyl. — Usitée pour la recherche de l'acétone, elle donne également de bons résultats pour la recherche de l'indol. A quelques centimètres cubes de la culture, on ajoute 4 à 5 gouttes d'une solution de nitro-prussiate de soude à 5 p. 100, puis, après mélange, quelques gouttes de lessive de soude à 40 p. 100; le liquide devient rougeâtre; en ajoutant une dizaine de gouttes d'acide acétique cristallisable, la coloration vire au bleu verdâtre ou au bleu s'il se trouve de l'indol.

Réaction de Crisafulli (1). — On prend un petit copeau bien sec de bois de pin ou d'autre conifère que l'on plonge dans le liquide à essayer, préalablement additionné de 1 à 10 gouttes d'acide chlorhydrique pur. Si le liquide contient de l'indol, le bois se colore en rouge-cerise ou en rouge violet. Le pyrrhol donne une même coloration, mais plus écarlate.

Réaction d'Ehrlich à la diméthylamidobenzaldéhyde (2). — La diméthylamidobenzaldéhyde donne avec l'indol en solution dans l'eau une coloration rouge intense. La coloration est très nette avec des proportions d'indol excessivement minimes, au millionième et au-dessus. On emploie les deux solutions suivantes :

Solution n° 1.

Paradiméthylamidobenzaldéhyde	1 gramme.
Alcool absolu	95 grammes.
Acide chlorhydrique pur	20 —

Solution n° 2.

Persulfate de potasse en solution saturée dans l'eau distillée.

A 10 centimètres cubes du liquide à éprouver, bouillon de culture ou distillat, on ajoute 5 centimètres cubes de la solution n° 1, puis 5 centimètres cubes de la solution n° 2, et on agite pour bien mélanger. S'il y a de l'indol, on observe après quelques minutes une coloration rouge intense. L'addition d'alcool amylique, comme précédemment (p. 336), rend encore la réaction plus nette.

Cette réaction serait bien plus sensible que la réaction indol-nitreuse. Elle pourrait faire reconnaître de l'indol là où cette dernière réaction n'en décèle pas.

(1) Crisafulli, La reazione rossa del legno di pino per la ricerca dell'indolo nelle culture in brodo dei microbi (*Rivista d'Igiene*, 1895, n° 5).

(2) Ehrlich, *Med. Woche*, 1901, n° 15; et : Freund et Lebach, *Berichte der deutsch. Chem. Gesellschaft*, XXXVI, 1901, p. 308.

En usant d'échelles colorimétriques, on peut arriver à doser l'indol, comme du reste avec les réactions précédentes.

Réaction de Buard à la vanilline (1). — A 10 centimètres cubes de bouillon de culture, déjà après quinze à vingt heures, Buard ajoute 5 à 6 centimètres cubes d'alcool absolu, puis, après mélange, 1 centimètre cube d'une solution alcoolique de vanilline à 0,02 p. 100, et enfin 3 centimètres cubes d'acide chlorhydrique pur. S'il y a de l'indol, il se produit de suite une coloration rose qui va en s'accentuant.

Réaction de Sicre et Escalion au furfurol (2). — Dix centimètres cubes de bouillon de culture sont additionnés à volume égal de solution alcoolique récente de furfurol à 1 p. 50, puis d'acide chlorhydrique pur, goutte à goutte. S'il y a de l'indol, il apparaît une teinte jaune, qui fonce au jaune orangé avec un peu plus d'acide.

En résumé, pour les constatations courantes, on peut se borner à la réaction indol-nitreuse, très sensible encore avec l'emploi de l'alcool amylique et surtout très peu coûteuse. Pour les cas difficiles, douteux, c'est la réaction d'Ehrlich qui paraît donner les résultats les plus sûrs.

Les nombreuses observations faites ont permis de dresser les tableaux suivants, qui rendent de bons services dans la pratique.

Principales espèces dont les cultures donnent la réaction de l'indol.

Bacillus acidi lactici (Hueppe).
— *amylobacter*.
— *aquatilis communis* (Flügge).
— *aquatilis* (Frankland).
— *arborescens* (Frankland).
— *aurantiacus* (Frankland).
— *botulinus*.
— *cavicida*.
— *Chauvæi*.
— *cloacæ* (Jordan).
— *coli communis*.
— *denitrificans* (Stutzer et Burri).
— *diphteriæ avium*.
— *Friedlaenderi* (traces).
— *janthinus* (peu).
— *lactis erythrogenes*.
— *prodigiosus*.
— *pseudodiphtericus*.
— *putrificus coli*.
Bacille rouge de Kiel.
Bacillus ruber (Lustig).
— *tetani* (peu).
— *vermicularis* (Frankland).
— *violaceus* (3).
— *viscosus lactis*.
Micrococcus pyogenes aureus.
— *pyogenes citreus*.
Sarcina aurantiaca (traces).

(1) Buard, Recherche de l'indol dans les cultures microbiennes (*C. R. de la Soc. de Biol.*, LXV, 1908, p. 158).

(2) Sicre et Escalion, Recherche de l'indol dans les cultures microbiennes à l'aide du furfurol (*Arch. de l'Inst. Pasteur de Tunis*, 1909, p. 21).

(3) Certains types de Bacilles violets n'en donnent pas. Leur différenciation est encore peu nette.

Sarcina lutea (traces).
Spirillum albense.
— *Bonhoffi.*
— *choleræ.*
— *danubicum.*
— *Finckleri.*
— *Ivanoffi.*
— *Massaouah.*
— *Metschnikowi.*
— *phosphorescens* (Dunbar).

Principales espèces dont les cultures donnent tardivement la réaction de l'indol.

Bacillus choleræ gallinarum (après quinze jours, avec la réaction d'Ehrlich) (1).
— *diphteriæ.*
— *pyocyaneus* } après quinze à vingt jours avec 5 p. 100 de peptones
Bacille du lait bleu } (Morris) (2).

Principales espèces dont les cultures ne donnent pas la réaction de l'indol.

Bacillus aerophilus.
— *anthracis.*
— *aquatilis sulcatus* I, II, III, IV, V.
— *caniperda* (Galli Valerio).
— *diphteriæ columbarum.*
— *diphteriæ cuniculi.*
— *dysenteriæ.*
— *enteridis.*
— *fœcalis alcaligenes.*
— *lactis aerogenes.*
— *mallei* (traces, d'après quelques auteurs).
— *megaterium.*
— *mesentericus ruber.*
— *mesentericus vulgatus.*
— *murisepticus.*
— *mycoides.*
— *ozœnæ.*
— *pseudobutyricus* (Hueppe).
Bacille du rouget du porc.
Bacillus septicus.
— *subtilis.*
— *suipestifer.*
— *suisepticus.*
— *tuberculosis.*
— *typhosus.*
— *Zopfii* (ou traces très faibles).
Bacilles paratyphiques.
Micrococcus candicans.
— *cereus albus.*
— *pyogenes.*
— *pyogenes albus.*
Méningocoque.
Gonocoque.
Micrococcus catarrhalis.
Proteus vulgaris (3).
— *Zenkeri.*

(1) Porcher et Panisset, Recherche de l'indol dans les bouillons microbiens (*Soc. de Biol.*, 24 avril 1909, p. 304).
(2) Morris, *Arch. für Hygiene*, XXX.
(3) Certains *Proteus vulgaris* donneraient de l'indol; d'autres une matière ayant des réactions semblables, mais un spectre différent.

Spirillum aquatile (Günther).
— *berolinense*.
— *liquefaciens* (Bonhoff).
Spirille de Lisbonne.
Spirillum tyrogenum.

Enfin, il est des espèces qui ne forment pas d'indol, mais peuvent fabriquer des composés indologènes, acide indol-carbonique notamment, qui dans certaines conditions, à la distillation surtout, peut, en se décomposant, mettre en liberté de l'indol qui ne préexistait pas dans la culture. C'est ce que Porcher et Panisset (1) ont observé avec le *Bacillus anthracis*, le *Staphylocoque doré*, le *Bacillus enteridis*, certaines variétés de *Bacillus fæcalis alcaligenes*. Ce fait et la différence de sensibilité des réactions employées expliquent les divergences d'opinion que l'on peut parfois constater.

Recherche des phénols.

Il faut aussi employer, comme milieux, les bouillons sans sucres. On peut utiliser le résidu obtenu comme il vient d'être dit (p. 335) ou procéder directement de la manière suivante. On traite le liquide par un cinquième de son volume d'acide chlorhydrique et l'on distille. Le distillat, neutralisé par le carbonate de chaux, donne, s'il y a des phénols, une belle couleur violette avec du perchlorure de fer neutre très étendu (*réaction de Jacquemin*). On ne trouve, en général, que très peu de ces corps, par exemple dans de vieilles cultures de *Proteus vulgaris*, de *Bacilles du tétanos*, de *Bacillus putrificus coli* et certaines variétés de *Colibacille* (2).

8. CONSERVATION DES CULTURES

Il peut être très utile ou avantageux de conserver aisément des cultures intéressantes par leur forme ou leur aspect, ou d'établir une sorte de musée de cultures pouvant être d'un haut intérêt pour la pratique ou l'enseignement. Les meilleurs résultats à ce point de vue obtenus jusqu'ici sont dûs à l'emploi de solutions d'aldéhyde formique ou formol. Le formol a la propriété d'insolubiliser et de durcir certains milieux, la gélatine en particulier, en lui conservant son aspect et sa transparence. Nous savons en outre qu'il possède des propriétés antiseptiques. En soumettant des cultures sur gélatine pendant quelque temps aux vapeurs du formol sous une cloche, ou en les plongeant dans une solution aqueuse faible (4 à 10 p. 100) de ce produit, la culture est immobilisée dans son aspect, qu'elle conserve pour ainsi dire indéfiniment, si l'on prend soin de s'opposer à toute évaporation par un bouchage parfait du vase (3).

Pour des cultures sur gélatine comme celles du *Bacille du charbon* au début, du *Bacille typhique*, il suffit de verser dans le tube, au-dessus

(1) Porcher et Panisset, Des composés indologènes dans les cultures liquides (*Acad. des sc.*, 17 mai 1909).
(2) Dobrwotski, Des microbes producteurs de phénol (*Ann. de l'Inst. Pasteur*., 1910, XXIV, p. 595).
(3) Hauser, Weitere Mittheilungen über Verwendung des Formalins zur Konservierung von Bakterienkulturen (*Münch. med. Wochenschr*., 1893, n° 35).

de la gelée, une dizaine de centimètres cubes de formol à 4 p. 100 et de fermer avec un bon bouchon que l'on paraffine, pour pouvoir les conserver indéfiniment avec leur aspect caractéristique primitif.

La modification de la gélatine est si profonde, lorsqu'elle a subi assez longtemps l'action du formol, qu'on n'arrive plus à la liquéfier même dans la flamme d'un bec de Bunsen ou en la faisant bouillir dans la lessive de soude.

Les cultures sur plaques en flacons plats (p. 286) se conservent très bien en remplissant d'une solution très étendue de formol et bouchant bien ; ou en cristallisoirs, en les plongeant dans un bocal contenant une telle solution.

Les cultures sur gélose, sur pomme de terre, se conservent aussi très bien de la même manière.

Souvent la solution de formol n'altère en rien l'aspect de la culture ; parfois la teinte seule change un peu. D'autres fois, pour les microbes chromogènes principalement, le liquide dissout une petite quantité de pigment et peut légèrement modifier la coloration de la colonie.

Pour les Bactéries liquéfiantes, il faut naturellement n'user que des vapeurs de formol. Les tubes de culture sont placés, débouchés, sous une cloche avec un récipient contenant une certaine quantité d'une solution concentrée de formol (40 p. 100) ; on les laisse quelques jours exposés au réactif. Il en est de même pour les Bactéries chromogènes dont la solution de formol modifie les pigments.

En vapeurs, Miquel (1) préfère user du trioxyméthylène, polymère de l'aldéhyde formique, que l'on mélange avec une solution concentrée de chlorure de calcium ; on obtient ainsi une pâte liquide qui dégage de fortes proportions de formol.

Il est très commode de mettre un peu de trioxyméthylène au fond d'un gros tube à essai dans lequel on place le tube de culture simplement bouché à la ouate ; les vapeurs d'aldéhyde formique qui se dégagent suffisent pour assurer la conservation.

III. — EXPÉRIMENTATION SUR LES ANIMAUX

Le complément indispensable de toute étude d'une espèce quelconque est la recherche de l'action qu'elle peut avoir sur l'organisme animal, pour en tirer ensuite, par déduction ou par d'autres expériences, des conclusions dont on conçoit la haute portée hygiénique. L'importance de cette condition est plus évidente encore pour les Bactéries pathogènes, où elle doit fournir le seul signe absolu, le seul critérium indéniable de la relation de cause à effet qui existe entre le parasite et la maladie. Enfin, l'organisme animal semble posséder une sorte d'affinité pour certaines espèces auxquelles il offre, dans un mélange, un terrain particulièrement favorable, au détriment des autres. Il se fait ainsi une sorte de triage ; l'espèce donnée prédomine bientôt et finit par l'emporter complètement ; les autres, inoculées avec elle, bien qu'en proportions souvent même plus fortes, disparaissent, étouffées par la luxuriante végétation de la première. A ce moment, l'organisme infecté offre tous les

(1) Miquel, De l'immobilisation des cultures sur les milieux solides au moyen des vapeurs de trioxyméthylène (*Ann. de micr.*, VI, 1894, p. 122).

caractères d'une véritable culture pure ; il servira aux mêmes usages et, en particulier, fournira une semence véritablement pure.

Cette méthode de culture naturelle est toute de Pasteur. Elle l'a conduit au début à la découverte d'une espèce redoutable, le *Bacillus septicus*, son *Vibrion septique* (1). En inoculant sous la peau d'un cobaye ou d'un lapin une petite quantité de terre végétale, qui contient un grand nombre d'espèces très différentes, la première arrive vite à occuper seule le terrain, y pullule et y détermine des troubles si profonds que l'animal succombe en présentant les symptômes caractéristiques de la *septicémie de Pasteur*. C'est un moyen journellement employé dans la pratique de laboratoire pour obtenir des cultures pures de la *Bactérie du charbon*. En inoculant du sang *non putréfié*, où cette espèce est mêlée à d'autres, l'animal meurt du charbon typique ; son sang, recueilli avec les précautions voulues pour ne pas introduire de germes du dehors, ne contient que du *Bacillus anthracis* et en donne des cultures très pures. On ne trouve aucune trace des autres Bactéries du mélange primitif. En mettant à profit ces résultats, Koch (2) est arrivé à isoler, de liquides putréfiés divers, d'autres espèces également fort intéressantes, occasionnant chez les animaux d'expériences des variétés de septicémie, surtout curieuses et instructives en ce sens que, très dangereuses pour l'animal qui les présente, elles le sont beaucoup moins, parfois même pas du tout, pour d'autres espèces animales. La différence d'action peut même être considérable entre deux espèces aussi voisines que le sont la souris des champs et la souris de nos maisons. La première, en effet, se montre complètement réfractaire à l'inoculation du *Bacillus murisepticus* de Koch, qui détermine chez la seconde une septicémie à marche particulière et promptement mortelle. De même, en inoculant à des lapins du sang putréfié d'autres lapins morts du charbon, Charrin (3) a pu obtenir un *Micrococcus* spécial tuant l'animal en peu d'heures, avant que le *Bacille du charbon* eût pu manifester son action pathogène.

Pour les trois raisons énoncées au début, l'expérimentation sur l'animal vivant joue en Bactériologie un rôle très important. Il nous faut donc poser les règles à suivre en pareil cas. Nous passerons en revue successivement les principes qui doivent guider dans le choix de l'animal sur lequel on veut expérimenter, les méthodes de contention qui permettent d'opérer aisément, la technique des inoculations expérimentales, la manière de pratiquer l'autopsie s'il y a lieu et la discussion des faits observés ; enfin nous croyons devoir dire quelques mots, en dernier lieu, sur l'expérimentation *in animâ nobili*, sur l'homme lui-même, qui tend à se répandre dans la pratique des laboratoires.

1° Choix de l'animal.

Le choix de l'animal importe peu, à condition cependant de le faire parmi les espèces pouvant être influencées par l'agent infectieux s'il s'agit de Bactéries pathogènes. On fait en général usage de Mammifères.

(1) Pasteur, Sur le Vibrion septique (*Bull. de l'Acad. de méd.*, 1877).

(2) Koch, Untersuchungen über die Ætiologie der Wundinfectionskrankheiten, 1878. — Zur Untersuchungen von pathogenen Organismen (*Mitth. aus dem kaiserl. Gesundheitsamte*, I, 1881).

(3) Charrin, Septicémie consécutive au charbon (*Soc. de Biol.*, 2 août 1884).

Les lapins, les cobayes, les rats et les différentes espèces de souris sont ceux dont on se sert le plus. Le chien est réfractaire à bien des maladies bactériennes; c'est une raison pour laquelle on ne s'en servira que rarement; le chat est trop méchant, l'expérimentateur doit s'en méfier. Les plus grands animaux sont réservés pour des cas tout spéciaux, à cause surtout de l'embarras et de la dépense qu'ils occasionnent.

Les oiseaux servent encore souvent; dans ce cas, c'est à la poule, au pigeon ou au moineau que l'on s'adresse le plus volontiers, à cause de la facilité de se les procurer. Il faut ici tenir compte des modifications que peut apporter leur température plus élevée que celle des Mammifères; cette différence peut faire changer les conditions d'expérience, comme nous l'avons déjà vu pour le charbon (p. 158).

Les Vertébrés à sang froid sont dans des conditions moins favorables encore pour ces expérimentations, à cause de leur basse température d'abord. Il est souvent possible de les porter à des températures eugénésiques pour les Bactéries, mais ils supportent souvent très mal ces conditions de chaleur; l'expérience peut ainsi se trouver faussée. Les grenouilles, que Gibier dit mourir en deux jours à 37° après une inoculation charbonneuse, périssent souvent en moins de temps à l'étuve à 37° sans aucune intervention. La *Rana temporaria* résisterait moins à la chaleur que sa congénère, la *Rana esculenta*, qui pourrait vivre des semaines à 37°, surtout lorsqu'on la nourrit de force, avec des vers ou de la viande. Les conditions de température ne sont pas les seules qui influent sur le sort des infections expérimentales chez ces Vertébrés à sang froid; Cuénot (1) et Mesnil (2) ont montré que le rôle principal dans la résistance dont ils paraissent jouir à l'égard de beaucoup d'infections devait revenir aux processus de phagocytose excessivement actifs qui se passent dans leur organisme. Les grenouilles, toutefois, résistent aux inoculations même massives de toxines virulentes, la toxine diphtérique par exemple. Ici, la phagocytose ne paraît pas intervenir; leurs humeurs ne m'ont pas cependant paru renfermer de substance antitoxique.

En multipliant les inoculations sur des espèces variées, on court la chance d'avoir à signaler chez quelques-unes des particularités intéressantes, qui pourront permettre de caractériser plus sûrement la Bactérie étudiée.

Les animaux en expérience doivent être éloignés de toute source de contagion, qui pourrait venir fausser les résultats acquis. Aussi ne saurait-on trop recommander de tenir les animaux sains loin de ceux inoculés et de ne jamais pratiquer d'inoculations dans le local où sont manipulés les cultures et les animaux qui ont succombé. C'est en omettant ces précautions que plusieurs expérimentateurs se sont exposés à des mécomptes. C'est en particulier pour s'être exposé à une contamination si facile que Büchner en a été conduit à proclamer l'identité du *Bacillus anthracis* et du *Bacillus subtilis*, que la forme et l'aspect peuvent faire considérer comme similaires, mais que l'action sur les animaux, entre autres caractères, différencie si facilement; le premier

(1) Cuénot, Études sur le sang et les glandes lymphatiques dans la série animale (*Arch. de zool. expér.*, 1891).

(2) Mesnil, Sur le mode de résistance des Vertébrés inférieurs aux invasions microbiennes artificielles (*Ann. de l'Inst. Pasteur*, V, 1895, p. 301).

est en effet parfaitement supporté par l'organisme, même à doses massives, tandis que la moindre quantité de l'autre détermine une affection charbonneuse toujours grave.

Il va sans dire que les animaux en expérience doivent être préservés de toute cause d'infection étrangère. Le local est tout particulièrement à surveiller; s'il se présentait des cas de septicémie, si fréquents sur les lapins, cobayes et souris, il serait désinfecté avec soin avant de s'en servir à nouveau. Les animaux doivent être préservés du froid et surtout de l'humidité auxquels beaucoup sont particulièrement sensibles. L'emploi de vases en verre pour les souris est à rejeter; il est préférable de les maintenir dans de petites cages en toile métallique ou en fil de fer qui sont, pour les souris de maison surtout, redoutant l'humidité, un logement infiniment plus sain. Ces cages sont en outre facilement désinfectées par la chaleur dans l'étuve à air chaud.

2° Contention de l'animal.

L'animal choisi, il faut le maintenir. L'opération se fait facilement avec les espèces de caractère doux et inoffensif. Les lapins et les cobayes seront simplement tenus par un aide, comme l'indique la

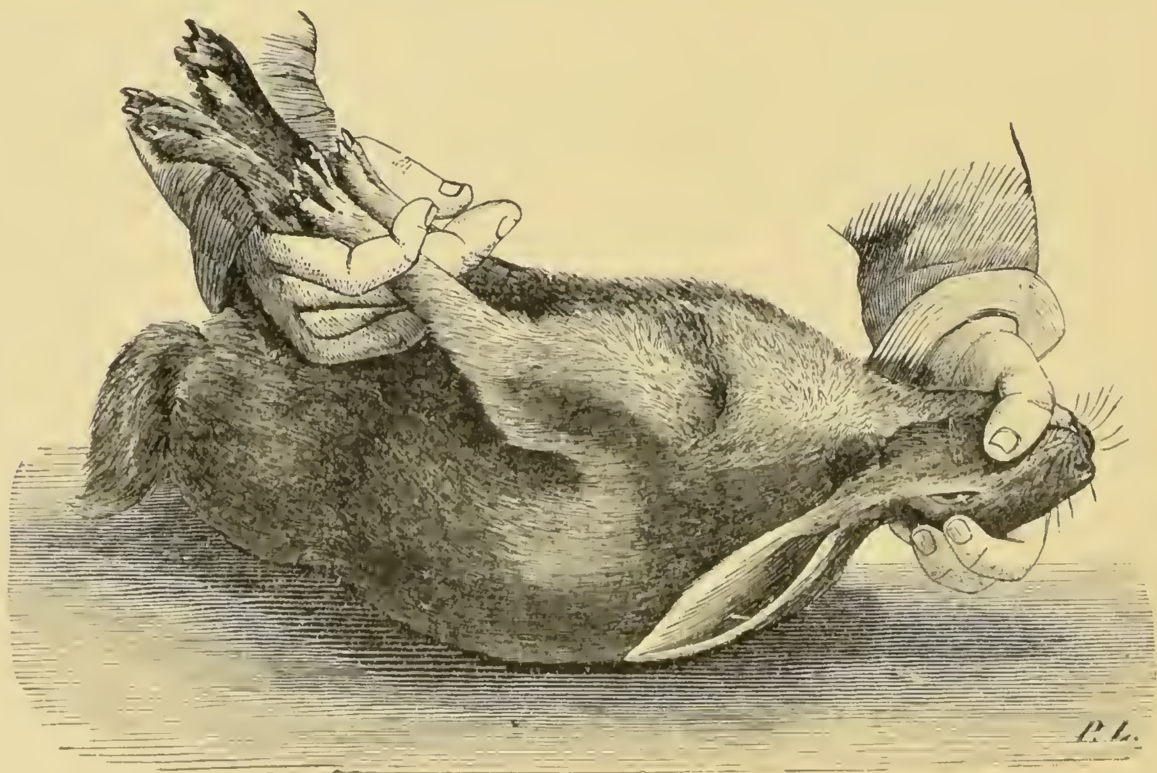


Fig. 170. — Contention simple du lapin par les deux mains d'un seul aide.

figure 170, ou out autrement. Il suffit souvent d'envelopper la tête du cobaye dans une serviette pour le faire rester tranquille quelque temps. Pour une opération assez difficile et un peu longue, il est bien préférable de se servir d'appareils de contention permettant d'immobiliser le sujet d'une façon très complète, et surtout de faire varier à volonté la disposition des différentes parties du corps, en rapport avec l'opération à exécuter. L'appareil de Czermak (fig. 171), celui de Malassez (1), celui

(1) Malassez, *Arch. de méd. expér.*, III, 1891. p. 396.

de Latapie (1), répondent très bien aux conditions requises; ce dernier, en particulier, peut servir à la fois pour le lapin, le cobaye, la poule, le

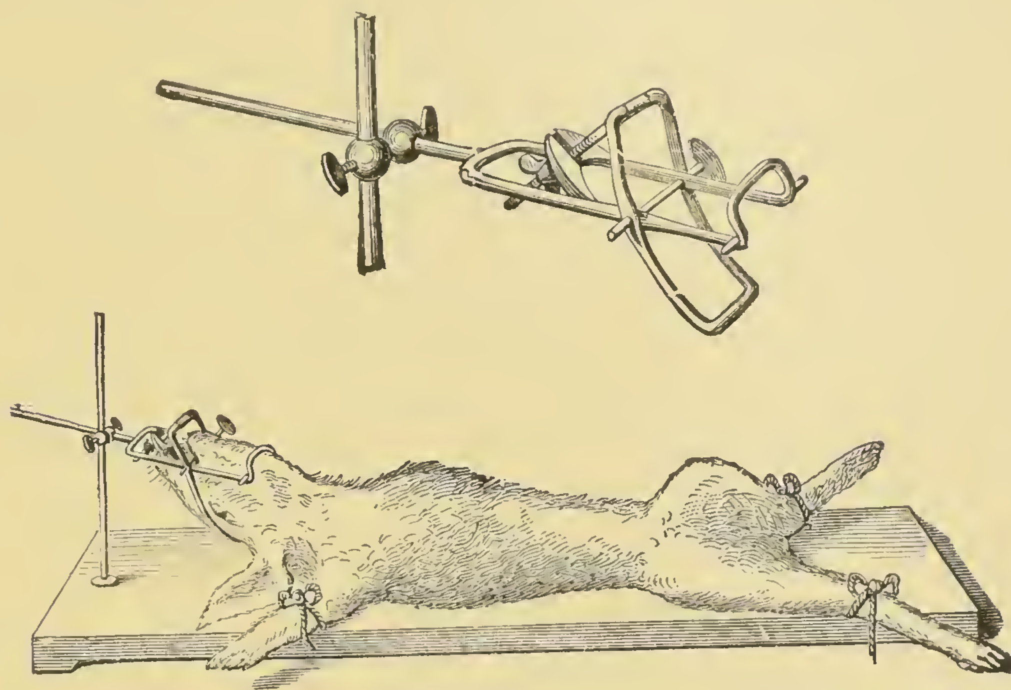


Fig. 171. — Appareil de Czermak. La figure supérieure donne des détails de l'appareil La figure inférieure montre un lapin immobilisé.

pigeon, en faisant varier les dispositifs mobiles qui maintiennent la tête et les pattes postérieures.

Le dispositif représenté figure 172 est des plus commode pour

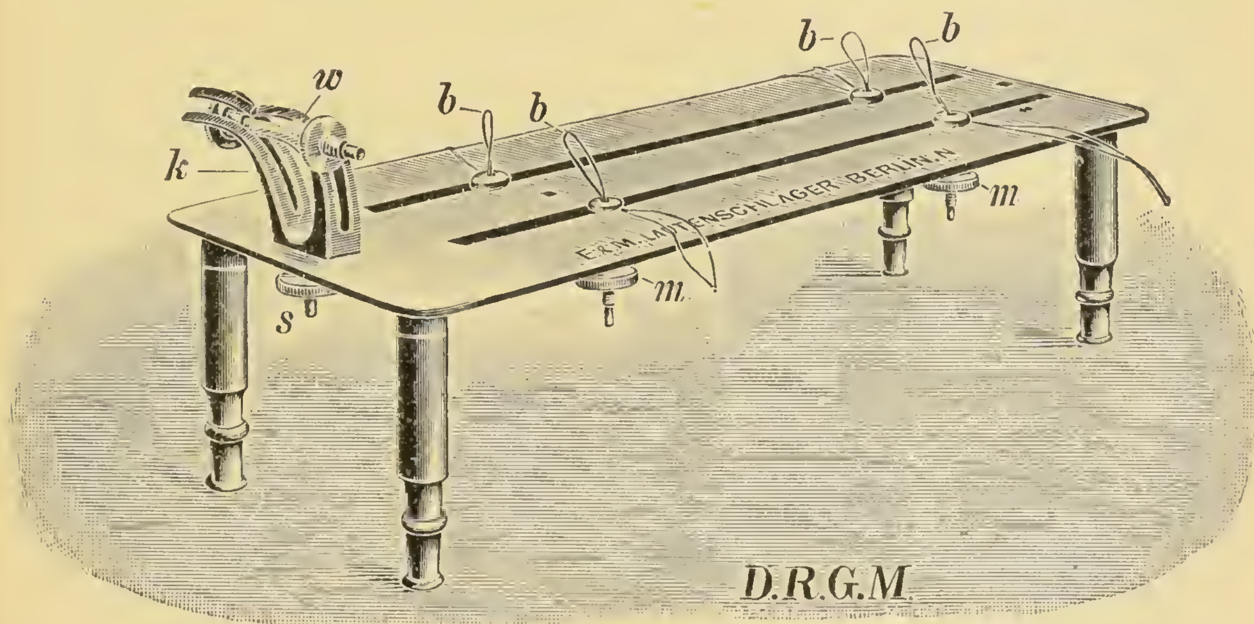


Fig. 172. — Appareil de contention de Piorkowski.

les cobayes et les rats. La figure montre sa composition et son maniement.

L'appareil de Debrand (2), très complet, permet d'opérer facilement

(1) Latapie, Nouvel appareil à contention pour animaux d'expérience (*Ann. de l'Inst. Pasteur*, VIII, 1894, p. 668).

(2) Debrand, Sur un nouvel appareil à contention (*Ann. de l'Inst. Pasteur*, XIV, 1900, p. 249, et Brochure complémentaire).

et rapidement, dans des situations très diverses, sur les animaux habituels.

Les rats sont assez à craindre ; les grosses espèces sont méchantes et possèdent des crocs redoutables.

Les souris sont d'un emploi plus facile. Les différentes espèces qui peuvent servir, souris de maison, souris des champs, souris blanches, sont toutes d'humeur fort paisible. Pour les petites opérations, les inoculations que l'on fait à la base de la queue, par exemple, il suffit de les placer, la tête en bas, dans un petit flacon de verre à large ouverture. Leurs pattes glissant sur la surface polie, il leur est impossible de prendre un point d'appui pour se retourner ; on peut d'ailleurs recouvrir le bocal en partie avec un couvercle, de manière à ne laisser dépasser que la partie du corps qui doit servir. On les maintient complètement immobiles, lorsque cela est nécessaire, en les tenant en outre par la nuque à l'aide d'une pince. On peut encore les placer dans une cage à barreaux assez écartés, attirer et maintenir la queue à l'extérieur pour agir sur le train postérieur de l'animal.

Pour opérer sur le cheval, la plupart du temps on peut se contenter du simple tord-nez tenu par une main ferme ; les chevaux difficiles ou les bovidés nécessitent souvent l'emploi de l'appareil bien connu sous le nom de *travail*.

Pour les bovidés, on peut se servir des tables à inoculations vaccinales, ou des appareils de contention usités en vétérinaire.

On trouvera de plus amples détails sur les moyens de disposer les animaux pour les expériences et de les mener à bonne fin dans les livres spéciaux de physiologie opératoire, en particulier dans les traités de Cl. Bernard et de Livon (1).

Pour les opérations un peu délicates, on a souvent grand avantage à recourir à l'anesthésie. La souris s'anesthésie rapidement en la plaçant sous un verre avec un tampon d'ouate imbibé de quelques gouttes d'éther ou de chloroforme. On anesthésie les cobayes, lapins, chiens, en leur plaçant sous le nez une éponge imbibée d'un peu de chloroforme.

Une balance ou une bascule est toujours nécessaire ; il faut prendre le poids de l'animal avant l'opération et suivre ses variations qui peuvent avoir un grand intérêt.

3° Inoculations.

On arrive de plusieurs manières à mettre les Bactéries, dont on veut étudier l'action, en contact plus ou moins direct avec l'organisme. Il faut, si l'on ne veut pas essayer toutes les *méthodes d'inoculation*, faire un choix parmi les principales, en se guidant sur les conditions particulières d'existence de l'espèce infectieuse étudiée, lorsqu'on en connaît quelques-unes. La *matière d'inoculation* doit être placée à portée de la voie qu'elle doit suivre pour se répandre dans l'organisme.

Les précautions à prendre pour l'inoculation sont les mêmes que celles conseillées pour l'ensemencement des cultures pures dans les milieux nutritifs ; l'expérimentation sur l'animal est une véritable

(1) Cl. Bernard, Leçons de physiologie opératoire. Paris, J.-B. Baillière, 1879. — Livon, Manuel de vivisections. Paris, J.-B. Baillière, 1882.

culture dans un milieu vivant. Il faut éviter l'apport de germes étrangers venant de l'air, de la surface du corps de l'animal, de ses organes internes, et enfin de la matière d'inoculation ou des instruments qui servent à l'introduire. La contamination par l'air n'est guère à craindre, car, outre qu'il ne montre presque jamais de germes pathogènes, l'inoculation proprement dite dure si peu de temps qu'aucune erreur n'est possible. On peut, du reste, se mettre dans les meilleures conditions en opérant dans un endroit tranquille, loin des courants d'air, où l'atmosphère a laissé déposer ses poussières et aussi les Bactéries qu'elle tenait en suspens. Il existe normalement chez l'homme et les animaux, à la surface de la peau ou des muqueuses, de nombreuses Bactéries, dont quelques-unes ont une action pathogène bien démontrée. Aussi faut-il s'efforcer d'en débarrasser les téguments à la place où l'on doit opérer. Pour ce faire, on lave d'abord fortement la peau au savon, puis à une solution de sublimé à 1 p. 1 000; on rince plusieurs fois à l'alcool et en dernier lieu à l'éther, dont l'évaporation se fait beaucoup plus rapidement. Lorsque la peau est couverte de poils, on les coupe à l'avance avec des ciseaux courbes ou, mieux, on les rase exactement. Il peut être plus commode de brûler la peau au thermocautère dans une certaine étendue : la brûlure doit être assez profonde et intéresser le derme.

L'animal d'expérience devra tout naturellement être absolument sain ; on doit écarter systématiquement ceux qui pourraient présenter le moindre symptôme morbide.

Il peut être nécessaire de pouvoir *doser* exactement la *quantité* de microbes à inoculer. On peut employer la méthode utilisée par Nicolle (1) dans son étude de la morve expérimentale du cobaye. Il prend comme *unité* de bacilles vivants d'une jeune culture sur gélose le centigramme. La pesée se fait sur une petite lame de carton lisse ou une lamelle de verre stérilisées. La quantité voulue est émulsionnée dans de l'eau physiologique en proportion déterminée; il est facile d'arriver par dilution à obtenir des doses d'un dixième, d'un centième, d'un millième, etc., de cette unité. La manipulation se fait avec une petite spatule de platine.

Enfin, il faut éviter d'apporter, avec la substance d'inoculation, des germes autres que ceux à étudier. Ce résultat est obtenu en prenant la matière dans des cultures d'une pureté reconnue et en n'utilisant que des instruments stérilisés en toute assurance. Cette stérilisation des instruments s'obtient facilement en les soumettant aux procédés habituels (Voy. p. 253 et suiv.). Les instruments d'acier seront chauffés une heure à 150° dans une étuve à air chaud, enfermés dans une boîte de métal ou dans une grosse éprouvette de verre de Bohême fermée par un tampon de coton, ou, mieux, mis à bouillir pendant un quart d'heure à une demi-heure dans de l'eau pure ou additionnée d'un peu de borax ou de carbonate de soude. Pour les instruments de petit volume et que l'on ne craint pas de détériorer, on peut simplement recourir au flambage dans la flamme d'un bec de gaz ou d'une lampe à alcool. Le modèle d'étuve représenté figure 173 est construit spécialement pour la stérilisation des appareils de métal et des instruments de chirurgie ; le

(1) Nicolle, Études sur la morve expérimentale du cobaye (*Ann. de l'Inst. Pasteur* XX, 1906, p. 629).

stérilisateur à air chaud décrit plus haut remplit du reste le même but. Les appareils plus délicats, ceux où entre du caoutchouc, seront mis un temps égal dans le stérilisateur à vapeur ou, mieux, dans l'autoclave à 120°. Pour certains, on doit recourir à la stérilisation chimique obtenue en les faisant macérer longtemps dans des antiseptiques énergiques, la solution de sublimé corrosif, une solution concentrée d'acide phénique,

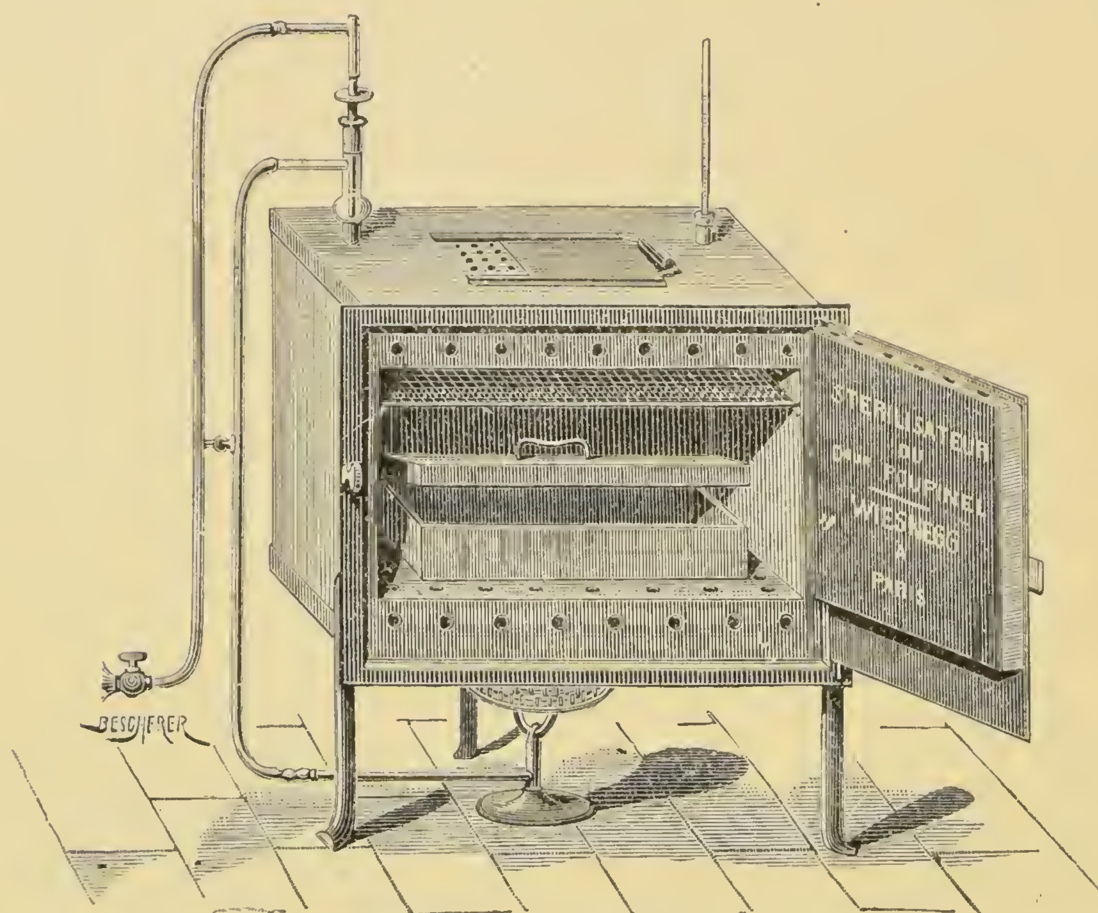


Fig. 173. — Stérilisateur du Dr Poupinel.

de formol. Un lavage à l'alcool fort les débarrasse du réactif lorsqu'il gêne. Un long séjour dans l'alcool absolu peut suffire et rendre, dans bien des cas, d'excellents services. Cependant, il faut toujours se défier de la stérilisation par ces antiseptiques.

1° *Instruments.*

Les instruments nécessaires à ces opérations sont tout d'abord les scalpels, pinces et ciseaux qui servent couramment pour toutes les opérations chirurgicales. Il est à recommander de prendre de préférence des scalpels entièrement métalliques ; leur stérilisation est plus assurée. De simples aiguilles peuvent très bien suffire pour certaines inoculations ; pour le charbon, on peut simplement tremper une aiguille dans du produit virulent et faire à son aide une simple piqûre. On peut encore, à l'aide d'un fil de platine chargé, déposer une petite quantité de virus à la surface d'une petite incision ou d'une petite plaie superficielle.

Les petites pipettes de verre étiré, telles que celles représentées figure 160, page 318, rendent de très bons services. On peut en avoir une provision stérilisée d'avance et à pointe fermée. La pointe est brisée

puis flambée légèrement; en aspirant par la grosse extrémité munie d'un tampon d'ouate, on y fait entrer la quantité voulue de liquide à inoculer. On fait ensuite pénétrer la pointe dans le tissu ou la cavité où l'on veut faire l'inoculation et l'on chasse le contenu en soufflant par l'extrémité opposée.

L'instrument le plus commode pour la pratique des inoculations est sans contredit la *seringue*. Comme il doit être facile de pouvoir stériliser sûrement et souvent les seringues dont on doit faire usage, il faut choisir des modèles qui résistent aux procédés employés. Les seringues à piston de cuir, du type de la seringue de Pravaz, ne peuvent pas servir ; sous l'influence de la chaleur, le piston se racornit et devient vite inutilisable, s'il ne l'est pas d'emblée. Depuis quelques années, on a imaginé de nombreux modèles de seringues qui puissent supporter facilement les procédés de stérilisation par l'eau ou la vapeur; nous ne pouvons citer que les principaux.

La *seringue de Koch* se compose d'un cylindre de verre gradué qui peut recevoir à une extrémité l'aiguille trocart de la seringue de Pravaz ; à l'autre extrémité se trouve un ajutage métallique à robinet auquel s'adapte une poire en caoutchouc. Le cylindre est stérilisé à l'autoclave ou à l'eau bouillante avec sa canule ; la poire sert à aspirer et à chasser le liquide à inoculer.

La *seringue de Straus*, que construit Collin, est un des modèles les plus recommandables. C'est une seringue analogue à celle de Pravaz, dont le piston est en moelle de sureau. La moelle de sureau supporte parfaitement la chaleur humide ; quand elle a été quelque peu comprimée, elle se gonfle et fait fermeture complète. Le piston se compose d'un disque de moelle de sureau de 1 centimètre de hauteur, disque serré par un petit écrou qui termine le piston. Il est facile de fabriquer soi-même de nouveaux pistons avec de la moelle de sureau bien souple et bien homogène, que l'on tasse entre deux doigts. Deux rondelles de moelle de sureau sont interposées entre les deux extrémités du cylindre de verre et l'armature métallique et assurent la fermeture parfaite de l'instrument.

La *seringue de Debove* (fig. 174), construite par Galante, a son piston et ses rondelles en amiante, supportant, par conséquent, aussi très bien la stérilisation. Elle est d'un démontage très facile. La contenance varie de 2 à 20 centimètres cubes, suivant le modèle.

La *seringue de Roux* a le piston et les rondelles en caoutchouc, résistant bien à la stérilisation et faciles, du reste, à remplacer.

Lüer construit une seringue tout en verre, formée d'un corps de seringue gradué à l'extrémité duquel s'adapte l'aiguille. Le piston est formé d'un cylindre de verre exactement calibré par rodage à l'émeri, qui glisse à frottement dans l'intérieur du corps de seringue. L'adaptation de ces deux parties doit être parfaite. Elle l'est en effet dans ce modèle excellent, facile à approprier, facile à stériliser, des plus simple à manier; le défaut est peut-être une fragilité un peu trop grande nécessitant des précautions.

On construit actuellement des modèles très solides où le corps de seringue, en verre gradué, est encastré dans deux extrémités métalliques, et le piston, exactement rodé, entièrement métallique.

On fait aussi d'après les mêmes données des seringues entièrement métalliques (1) qui présentent comme seul inconvénient leur opacité ; on ne peut pas voir leur contenu. L'inconvénient est compensé par la graduation de la tige du piston et par une solidité très grande.

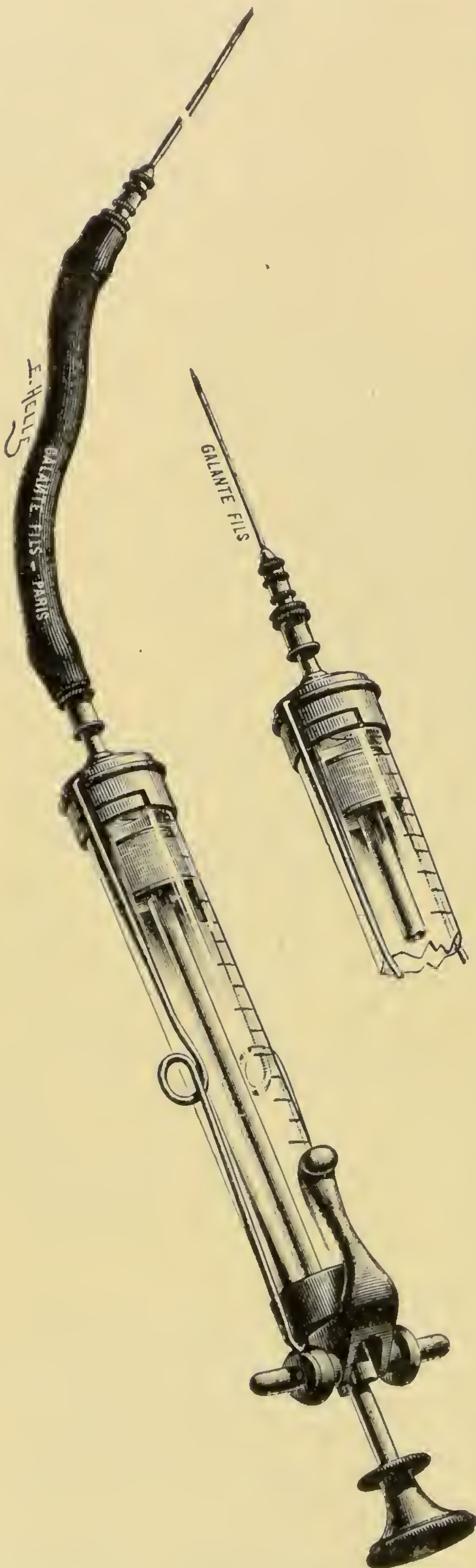


Fig. 174. — Seringue stérilisable de M. le professeur Debove.

Les *aiguilles* doivent naturellement être stérilisées comme la seringue.

Cette stérilisation peut s'obtenir en faisant simplement bouillir la seringue dans l'eau pendant un quart d'heure. Il faut alors prendre la précaution de desserrer quelque peu l'armature de la seringue, ou même de retirer tout à fait le piston lorsqu'il est plein, pour donner de la liberté au cylindre de verre et lui permettre de se dilater. Il est à recommander aussi de faire pénétrer d'avance de l'eau dans la seringue ; l'équilibre de température s'obtient plus vite. Lorsque la stérilisation doit être absolue, il est préférable de stériliser les seringues à l'autoclave ; on a souvent avantage à stériliser la seringue toute montée dans un gros tube à essai fermé avec de la ouate hydrophile.

Les aiguilles en *acier* s'oxydent dans l'eau bouillante ; on peut éviter en partie cet inconvénient en ne les mettant dans l'eau que lorsqu'elle a bouilli, puis en les plongeant dans l'alcool absolu au sortir de l'eau ou dans une solution de borax. Après passage à l'eau, avant de les rentrer, il faut les essuyer soigneusement et les sécher rapidement à une douce chaleur ou en soufflant fortement par l'embout. Les aiguilles en *platine iridié* ne s'oxydent pas et peuvent même être stérilisées en les portant au rouge dans une flamme ; elles piquent cependant moins bien que celles d'acier ; de plus, le platine est souvent mal iridié et devient alors facilement cassant. Il faut entretenir avec soin les aiguilles d'acier, les frotter à l'extérieur avec de l'émeri

(1) Herbet, 62, rue de Provence, Paris.

très fin et aiguiser chaque fois l'extrémité tranchante sur une pierre ou du papier d'émeri. Après les avoir nettoyées et avant de s'en servir, il faut passer un fil métallique à l'intérieur.

Lorsqu'on veut inoculer ou retirer une grande quantité de liquide, il faut se servir de trocarts plus ou moins gros, ceux de l'appareil Dieulafoy par exemple, auxquels on peut, du reste, adapter une seringue de contenance voulue.

On peut avoir à employer le *trépan* lorsqu'on veut agir directement sur les centres nerveux par exemple. La trépanation est une opération trop spéciale pour être décrite ici ; on mettra en œuvre les indications données dans les Traités de chirurgie.

2° *Matière d'inoculation.*

Les matériaux qui doivent servir à inoculer sont ou des produits de cultures ou des produits pathologiques. Ces produits sont liquides ou solides.

Pour les liquides, il n'y a aucune difficulté. Ils sont aspirés aseptiquement avec les pipettes ou les seringues stérilisées.

Le sang, se coagulant facilement, est difficile à injecter avec une seringue ou une pipette qu'il obture souvent aussitôt. Il faut laisser la coagulation se produire dans un vase, puis injecter le sérum et traiter le caillot comme les matières solides.

Les produits solides peuvent être inoculés directement, sous la peau ou dans une cavité naturelle par exemple. Ou ils peuvent être mis en suspension dans un liquide stérile, eau ou bouillon ; c'est le cas des cultures sur milieux solides. Il suffit parfois de les délayer simplement dans le liquide; d'autres fois, il faut les triturer, les broyer, pour les dissocier convenablement et en faire une véritable émulsion. Il est naturel que ces opérations doivent se faire d'une façon tout à fait aseptique.

3° *Voies et méthodes d'inoculation.*

On peut introduire la matière d'inoculation dans l'organisme de différentes façons. L'expérimentateur se rappellera que les effets produits peuvent être variables suivant le point d'introduction; on en trouvera de nombreux exemples dans l'étude des espèces.

Les microbes peuvent pénétrer dans l'organisme par la voie intestinale, par la voie pulmonaire, par la surface tégumentaire ; on peut encore les inoculer dans le sang, dans la cavité péritonéale, dans la plèvre, dans la chambre antérieure de l'œil, sous la dure-mère.

1. INOCULATION PAR INGESTION

Les germes contagieux peuvent être introduits par l'*intestin*. Pasteur a jeté une vive lueur sur l'étiologie du charbon des animaux domestiques en montrant que l'infection était possible si des germes de la Bactérie spéciale venaient à être introduits dans le tube digestif. Il est vrai que l'intégrité absolue des voies digestives, de l'entrée à la sortie, est une barrière très sûre contre l'invasion, mais c'est le cas le plus rare ; il se trouve d'habitude quelque petite éraillure par où le parasite peut pénétrer dans la circulation. Toutes les causes qui lèsent l'intestin aug-

mentent les chances de contagion ; en mêlant des substances dures ou piquantes aux aliments, Pasteur a rendu charbonneux toute une série de moutons qu'il voulait contaminer. Il est même démontré aujourd'hui qu'il suffit de lésions d'importance bien moindre, d'une simple congestion de la muqueuse. D'autres fois, c'est à la destruction par les sucs intestinaux des Bactéries ingérées qu'il faut s'opposer. L'acidité du suc gastrique surtout est souvent nuisible ; on y remédie en introduisant dans l'estomac, peu avant l'expérience, quelques centimètres cubes d'une solution de carbonate de soude. Il est du reste impossible, à l'heure actuelle, de tracer des règles générales ; c'est à l'expérimentateur de chercher à tourner de son mieux les difficultés qui se présentent. On peut simplement mêler la matière d'inoculation aux aliments ; ou bien on la fait pénétrer directement dans l'estomac à l'aide d'une sonde ou dans le pharynx avec une pipette, en maintenant la tête élevée.

2. INOCULATION PAR INHALATION

L'*inhalation* semble avoir donné quelques résultats positifs. Friedlaender (1) a pu déterminer des pneumonies véritables en faisant respirer à des souris de l'air chargé du *Micrococcus de la pneumonie*. On arrive à ce but par divers artifices. On peut pulvériser, dans l'atmosphère où est placé l'animal, de l'eau chargée de la Bactérie à étudier, prise dans une culture pure. Ou bien, on insuffle directement dans les voies respiratoires des cultures desséchées à basse température et réduites en poudre, pures ou mêlées avec des éléments très fins comme des spores de Lycopode ou de Lycoperdon. L'état de la substance à insuffler influe considérablement sur les résultats de l'expérience. Cadéac et Mallet (2) ont montré, dans une série d'expériences dont le résultat pratique n'échappera à personne, que la tuberculose était parfaitement inoculable par inhalation de liquides pulvérisés tenant en suspension des Bacilles tuberculeux. L'infection s'observe au contraire très rarement lorsque les mêmes agents sont incorporés à des poussières. Il est encore facile de placer l'animal sous une cloche où l'on pulvérise des liquides chargés des produits à expérimenter.

3. INOCULATION PAR LA PEAU

L'*application simple sur la peau*, suivie ou non de frictions, peut déterminer une infection localisée ou générale. Garré (3) a réussi à produire sur son bras un anthrax en frottant la peau de cette place, lavée et stérilisée d'avance, avec une culture pure de *Micrococcus pyogenes aureus* de troisième génération. L'anthrax était entouré d'une couronne de petits furoncles ; dans ces divers foyers de suppuration, le *Micrococcus* employé se rencontrait en nombre considérable. Bockhart (4) a pu déterminer des symptômes blennorragiques en

(1) Friedlaender, Die Mikrokokken der Pneumonie (*Fortschr. der Med.*, 1883).

(2) Cadéac et Mallet, Recherches expérimentales sur la transmission de la tuberculose (*C. R. de l'Acad. des sc.*, 12 décembre 1887).

(3) Garré, Zur Aetiologie acuter citriger Entzündungen (*Fortschr. der Med.*, 1885).

(4) Bockhart, Beiträge zur Aetiologie und Pathologie des Harnröhrentrippers (*Vierteljahrschr. für Derm. und Syph.*, 1883).

amenant des cultures pures de *Micrococcus gonorrheæ* au contact de la muqueuse urétrale saine. D'après des recherches de Babès, le *Bacille de la morve* pourrait aussi traverser la peau saine et causer une morve caractéristique. Le mode de pénétration de la Bactérie infectieuse dans ces cas est encore bien obscur ; les glandes de la muqueuse ou de la peau paraissent devoir jouer le principal rôle. Courmont et Lesieur (1) ont observé le passage du *Bacille tuberculeux* à travers la peau saine, surtout épilée, chez le cobaye, le veau et le lapin.

La méthode d'*inoculation sous-cutanée* est de beaucoup la plus employée ; c'est aussi elle qui donne les résultats les mieux connus. Les phénomènes y sont cependant complexes. La matière d'inoculation est portée dans le tissu cellulaire sous-cutané ; mais elle trouve là différentes voies de pénétration ; il est parfois bien difficile de déterminer celle qui est suivie.

Avant tout, la peau doit être préparée à l'opération comme il a été dit page 313, lorsqu'il s'agit d'expériences absolument rigoureuses.

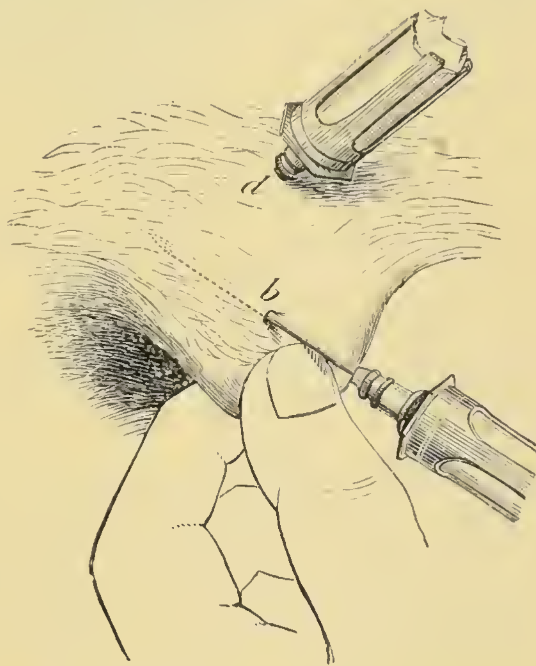


Fig. 175. — Injection hypodermique (manuel opératoire).

Le moyen le plus simple consiste à faire, de l'extrémité d'un bistouri, une petite boutonnière à la peau que l'on soulève avec une pince. On creuse légèrement le tissu cellulaire avec une sonde cannelée, et dans la dépression produite on introduit une parcelle de la matière d'inoculation que le tissu enserre en revenant sur lui-même. Rappelons que les instruments doivent être stérilisés bien sûrement et qu'il serait imprudent de reprendre un instrument qui a été déposé, ne fût-ce que quelques secondes. Il faut donc prendre soin de s'approvisionner d'avance. C'est le procédé courant suivi dans les laboratoires pour se procurer de la matière tuberculeuse pure. On inocule un cobaye sous l'abdomen avec un produit tuberculeux quelconque ; quinze jours ou trois semaines après, il est bon à sacrifier, ses organes sont d'ordinaire farcis de tubercules. On a souvent avantage à se servir d'une seringue.

Pour l'inoculation, on choisit de préférence une région du corps où le tissu cellulaire sous-cutané est très lâche. On tire la peau de façon à lui faire faire un gros pli (fig. 175) ; on brûle au fer rouge une place très limitée ou on l'aseptise très soigneusement par des lavages au sublimé après avoir rasé les poils et, à l'endroit voulu, on introduit la canule de la seringue soigneusement stérilisée ou flambée. On vide la seringue de son contenu qui se répand dans le tissu conjonctif.

La souris doit être inoculée sous la peau du dos à la racine de la queue, ou à la base de la cuisse. Le cobaye a, en bien des endroits du corps, une peau épaisse et dure, une véritable couenne ; l'endroit le

(1) Courmont et Lesieur, Passage du bacille tuberculeux à travers la peau chez le cobaye, le veau, le lapin (*C. R. de la Soc. de Biologie*, LXII, 1907, p. 1143).

plus favorable à la pénétration de l'aiguille est le milieu des pattes postérieures. Le lapin s'inocule facilement sur les membres ou sur le dos.

4. INOCULATION INTRAVEINEUSE

Elle se fait en injectant dans une veine, à l'aide d'une seringue ou d'une pipette effilée, une certaine quantité de liquide. Le liquide doit être filtré ou ne tenir en suspension que des éléments très fins, passé sur un linge de batiste par exemple ; la présence de grumeaux détermine facilement une embolie mortelle.

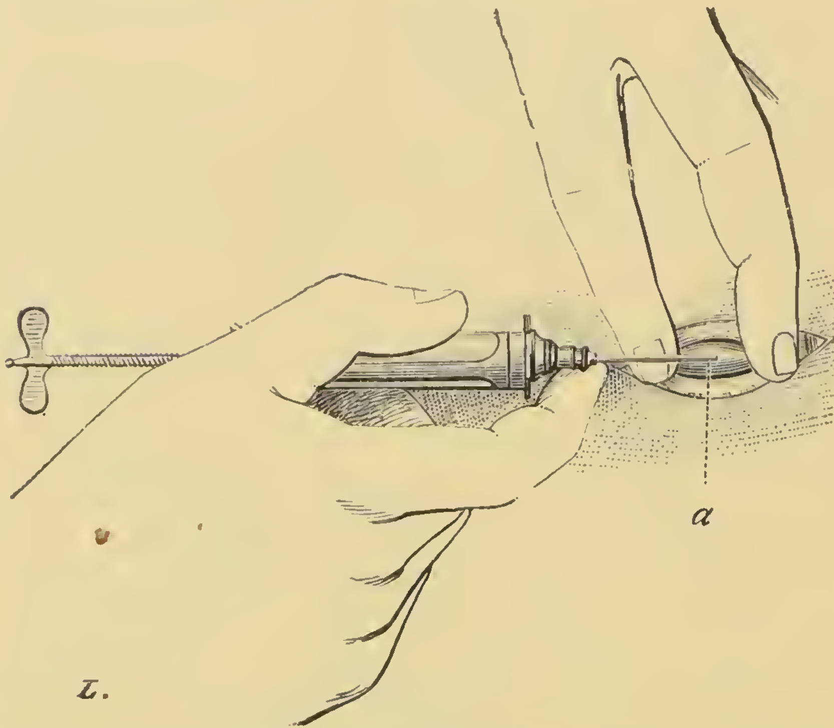


Fig. 176. — Injection intraveineuse avec une seringue à petite canule acérée (a) (Cl. Bernard).

Ces *injections intraveineuses* offrent souvent le grand avantage d'une action beaucoup plus prompte ; de plus, il ne peut y avoir de méprise sur la voie exacte qu'a suivie l'infection. Les effets produits, il faut se le rappeler, peuvent être tout différents, en plus ou en moins, de ceux déterminés par l'injection sous-cutanée par exemple ; l'étude des espèces en fournira des preuves nombreuses.

Le manuel opératoire est relativement simple lorsqu'on a facilement à sa portée une veine assez grosse, comme plusieurs veines de l'oreille du lapin, surtout les marginales, plus grosses et facilement accessibles. On coupe les poils aux ciseaux courbes et on lave soigneusement au sublimé. On comprime la portion de veine à son bout central pour la faire gonfler et l'on pique avec l'aiguille de la seringue tenue à la main ou portée par un petit mandrin de bois. Si l'aiguille est réellement dans la veine, on voit sourdre une goutte de sang par son ouverture postérieure. On cesse la compression, on adapte la seringue et l'on pousse *doucement* l'injection dans le *sens du courant sanguin*. L'inoculation terminée, on retire l'aiguille ; le petit orifice de la paroi veineuse se referme de suite.

Lorsque la veine est située plus profondément, il faut la dénuder. La figure 177 indique la direction et l'étendue de l'incision qui permet de découvrir la veine jugulaire du lapin. Chez le cobaye, il est nécessaire de s'adresser à la jugulaire que l'on met aussi à nu préalablement ; les veines superficielles sont trop petites. Chez le chien, c'est la veine saphène qui offre le plus de facilités. On l'aperçoit facilement sous la peau de la face externe de la partie terminale de la patte, faisant un angle aigu avec le tendon d'Achille. En incisant la peau, on la met faci-

lement à nu. Souvent, pour ces petites veines, surtout quand l'injection doit être de quelque durée, on a intérêt à isoler le vaisseau sur une sonde cannelée avant de le ponctionner. Chez le cheval, il est très facile de pénétrer dans la jugulaire, en faisant une petite incision à la peau, comme il a été dit pour la saignée (p. 235) ; ici, le vaisseau est

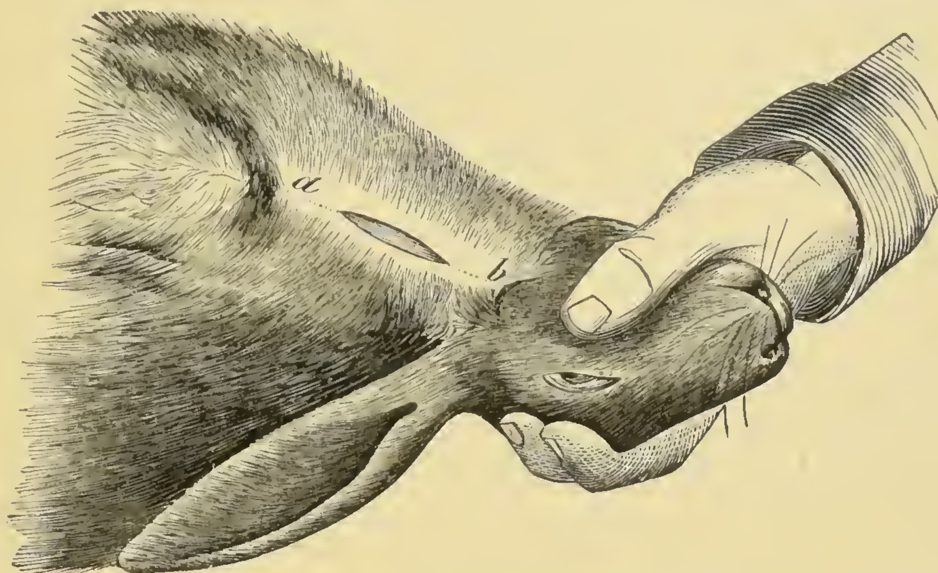


Fig. 177. — Veine jugulaire du lapin; direction de l'incision (*ab*) par laquelle on arrive sur cette veine (Cl. Bernard).

assez gros pour qu'on puisse le ponctionner d'autorité. Chez les oiseaux, on fait l'injection dans la veine axillaire que l'on aperçoit sous l'aile, immédiatement sous la peau.

5. INOCULATION INTRAPÉRITONÉALE

Les *injections intrapéritonéales* peuvent se faire avec des seringues ou avec des pipettes de verre effilées, lorsque la matière à inoculer est tant soit peu épaisse et visqueuse.

L'inconvénient à éviter est la perforation de l'intestin. On pince la peau et les muscles de l'abdomen et l'on pousse hardiment l'aiguille dans le bourrelet soulevé pour le séparer de la masse intestinale ; on s'assure par la palpation que l'aiguille n'est pas passée sous la peau. On peut aussi faire une petite boutonnière à la peau du ventre préalablement stérilisée : les muscles apparaissent; on les traverse doucement avec l'aiguille ou l'extrémité effilée de la pipette, jusqu'à ce qu'on sente la résistance cesser.

Si l'on veut introduire dans le péritoine un corps massif quelconque, un fragment d'organe par exemple, il faut faire une petite laparotomie. On fait une petite incision, sur la ligne blanche, jusqu'à l'aponévrose, qu'on soulève avec une pince, et, avec des ciseaux, on fait une ouverture à la base du pli pour ouvrir le péritoine. On agrandit l'incision en se servant d'une sonde cannelée pour diriger l'instrument. L'objet est introduit. On ferme rapidement l'incision par une pince à pression, puis on met des points de suture séparément sur le péritoine, sur la couche musculaire et en dernier lieu sur la peau. Naturellement, il faut procéder avec la plus grande asepsie.

Pour étudier l'action directe des produits formés par les microbes,

ou pour mettre les microbes dans des conditions particulièrement favorables qui permettent souvent d'exalter d'une façon très notable leur virulence, l'emploi de l'introduction dans le péritoine d'animaux divers, cobaye, lapin, chien, mouton, etc., de sacs de collodion remplis de bouillon ensemencé est des plus recommandable. Ce procédé a été imaginé par Metschnikoff, Roux et Salimbeni (1) pour leurs études sur la toxine et l'antitoxine cholériques ; il a été appliqué depuis, et avec succès, à bien des espèces, pathogènes ou non. C'est une véritable culture *in vivo*.

On prépare de petits *sacs de collodion* de la contenance de 1 à quelques centimètres cubes, à paroi très mince, en enroulant un peu de collodion, non riciné de préférence, sur l'extrémité fermée d'un tube à essai ou en plongeant cette extrémité dans le collodion sur une hauteur un peu plus grande que celle voulue pour le sac. On retire, on fait égoutter l'excès, puis on recommence une ou deux fois pour avoir un peu d'épaisseur ; on continue à tourner pendant quelques minutes pour laisser le collodion prendre de la consistance sans changer de forme. A l'Institut Pasteur, on prend l'extrémité extérieure du tube ; on semble mieux réussir en opérant à l'intérieur du tube. On laisse sécher ; le petit doigt de gant, obtenu en coupant à la partie supérieure, se sépare facilement du verre. On trouve, du reste, de ces sacs tout prêts dans le commerce. Les sacs sont stérilisés à l'autoclave dans des tubes à essai fermés d'ouate. On les retire avec une pince stérilisée au moment du besoin et l'on y verse la quantité voulue de bouillon ensemencé, puis on ferme avec un fil de soie aseptisé. On les introduit alors dans le péritoine de l'animal en prenant les précautions aseptiques nécessaires pour une telle opération et en suivant les indications qui viennent d'être données. L'animal ne souffre pas d'ordinaire, ni de l'intervention ni de la présence du sac dans la cavité péritonéale. Le sac peut être repris au bout d'un temps variable, quelques jours à plusieurs mois, en sacrifiant l'animal. La paroi de collodion empêche la sortie des microbes et les met à l'abri des phagocytes, mais laisse s'opérer les échanges osmotiques qui modifient, d'un côté, la composition du liquide enfermé, et, de l'autre, laisse diffuser les produits sécrétés par le microbe. D'après Rodet et Moitessier (2), cette diffusion serait limitée à cause du peu de perméabilité de la membrane de collodion. En ouvrant le sac, on y trouve d'ordinaire une culture très abondante de virulence très marquée qui peut alors s'accroître beaucoup par une série de passages opérés de la même manière ; il faut faire l'ouverture avec toutes les précautions d'asepsie voulues, en brûlant le fond avec un tube de verre chauffé et en perforant à cet endroit avec une pipette effilée.

Le sac de collodion peut être remplacé par un segment plus ou moins long de la fine membrane tubulaire qui tapisse la cavité centrale du roseau, qu'on lie à ses deux extrémités, ou tout autre produit analogue (3).

(1) Metschnikoff, Roux et Salimbeni, Toxine et antitoxine cholériques (*Ann. de l'Inst. Pasteur*, X, 1896, p. 257).

(2) Rodet et Moitessier, Sur la perméabilité des membranes de collodion (*Soc. de Biol.*, 26 juillet 1902).

(3) Nocard et Roux, Le microbe de la péripneumonie (*Ann. de l'Inst. Pasteur*, XII, 1898, p. 244).

6. INOCULATION INTRAPLEURALE

On pique dans les premiers espaces intercostaux, près du creux axillaire ; on fait de même l'*inoculation intrapulmonaire*. Pour l'*inoculation intratrachéale*, on met la trachée à nu au moyen d'une petite incision faite au-dessous du larynx, puis on pousse l'aiguille entre deux anneaux ; après, on fait un point de suture à la peau.

7. INOCULATIONS DANS LA CHAMBRE ANTÉRIEURE DE L'ŒIL

Elles sont très avantageuses à utiliser dans bien des cas. D'abord, les lésions produites se voient souvent bien et peuvent être suivies dans leur développement macroscopique. De plus, c'est une voie simple et facile à emprunter pour agir sur les centres nerveux. La pratique de ces injections est des plus aisée. On insensibilise l'œil avec quelques gouttes de solution de chlorhydrate de cocaïne, et, quand l'anesthésie est complète, on enfonce l'aiguille perpendiculairement dans la chambre antérieure de l'œil, que l'on maintient fixe entre le pouce et l'index. Ou bien on fait, à l'aide d'un couteau à cataracte, une petite incision sur le bord supérieur de la cornée et on fait pénétrer la matière à inoculer.

8. INOCULATION INTRACRANIENNE

On choisit la région frontale ou temporale. On incise la peau et le périoste, puis on pose une couronne de trépan de 5 à 10 millimètres de diamètre. Il faut aller prudemment pour ne pas perforer la dure-mère. On enlève la rondelle d'os et l'on aperçoit de suite la dure-mère, que l'on pique obliquement pour ne pas pénétrer dans la substance cérébrale, en évitant de blesser un gros vaisseau ; l'injection est poussée lentement. Pour l'*inoculation intracérébrale*, l'aiguille est enfoncée directement dans le cerveau. Pour l'*inoculation intrarachidienne*, on peut suivre les indications données pour la ponction lombaire (p. 315). On aspire une petite quantité de liquide céphalo-rachidien que l'on remplace par la matière d'inoculation.

Les suites opératoires de ces diverses interventions sont d'ordinaire très simples. Le plus souvent, il suffit de faire aux petites plaies des lavages antiseptiques ou de les toucher avec une baguette de verre fortement chauffée. Si les incisions sont de quelque importance, il est bon de faire une suture avec l'aiguille de Reverdin. On peut aussi placer un pansement aseptique ; c'est surtout nécessaire lorsque la plaie se trouve à un endroit que l'animal peut lécher ou gratter.

Les animaux en expérience doivent naturellement être mis dans des conditions de vie irréprochables et être surveillés avec soin. Les cages doivent pouvoir être désinfectées avec soin ; celles en fil de fer galvanisé répondent à toutes les exigences.

Ce n'est, répétons-le, qu'en se plaçant dans des conditions d'expérience aussi rigoureuses qu'on se trouve en droit de formuler des conclusions véritablement scientifiques et à l'abri de tout reproche.

On ne doit jamais demander à l'expérimentation plus qu'elle ne peut

donner. Certaines maladies infectieuses semblent ne pouvoir se développer avec leur cortège de symptômes bruyants que dans une seule espèce ou tout au plus quelques-unes, dans les conditions habituelles d'expérience. On n'est pas en droit d'en faire un signe absolu pour rejeter la spécificité de la maladie où le germe a été observé. Les exemples de faits pareils se rencontrent à tout instant ; n'avons-nous pas vu, par exemple, la souris des champs résister au Bacille de la septicémie qui tue si rapidement la souris de maison ? D'ailleurs, il n'est pas à dire qu'en variant les conditions d'expérience on ne puisse arriver à un résultat satisfaisant. L'histoire du choléra servira à convaincre les plus incrédules.

Il peut être en effet nécessaire, pour provoquer ou favoriser l'infection, de modifier les conditions normales de l'animal d'expérience en affaiblissant l'une quelconque de ses fonctions ou un organe déterminé. On crée ainsi une véritable *prédisposition*, imitant très probablement ce qui se passe souvent dans la nature, où l'infection ne peut se faire que lorsque les moyens de résistance de l'organisme sont amoindris ou même anéantis.

4° Examen de l'animal vivant.

Les animaux inoculés peuvent être soumis aux méthodes ordinaires d'examen et d'exploration. On doit noter avec soin l'aspect de l'animal, l'état de l'endroit de l'inoculation, la production d'une lésion locale s'il y a lieu, les modifications de température, de poids, l'état des fèces et des urines.

Au cours du développement de la maladie provoquée par l'inoculation, on peut avoir intérêt à examiner du sang, des humeurs ou des produits pathologiques. On recueille ces produits tout à fait aseptiquement, comme il a été dit précédemment pour l'ensemencement des milieux (p. 313). On les soumet ensuite aux procédés d'examen nécessaires.

5° Autopsie et discussion des résultats.

On doit souvent mettre à mort l'animal pour étudier les lésions produites, s'il ne succombe pas à l'infection. On peut recourir à l'asphyxie par le chloroforme ou le gaz d'éclairage, qui est à préférer si l'on veut faire des coupes d'organes, ou à un empoisonnement aigu ; le mieux, dans ce dernier cas, est de s'adresser à la nicotine ou à l'acide prussique. On peut aussi facilement piquer le bulbe avec un scalpel à lame mince et courte que l'on introduit entre l'occipital et l'atlas.

L'autopsie doit se faire régulièrement, l'animal étant solidement fixé sur une planchette à trous. La récolte des produits suspects doit être faite très soigneusement ; les prélèvements destinés aux cultures surtout doivent être recueillis d'une façon absolument aseptique, comme cela a été indiqué page 313.

L'autopsie terminée, il est souvent nécessaire de désinfecter les cadavres. On peut les stériliser à l'autoclave, si l'on ne craint pas de produire des odeurs désagréables. En hiver, les cobayes, et même les lapins, sont facilement incinérés dans les grands fourneaux des laboratoires. Il existe des modèles très commodes de petits fours crématoires

pour ces incinérations ; malheureusement, ils sont coûteux. On peut aussi utiliser les solutions antiseptiques fortes ou la destruction par l'acide sulfurique suivant le procédé d'Aimé Girard, ou le mélange à parties égales d'acide sulfurique et de bichromate de potasse ou de soude. Avec les deux derniers moyens, il faut tenir compte de l'échauffement et de l'augmentation de volume du bain.

Dans la discussion des résultats, il ne faut pas se départir d'une grande prudence et se souvenir surtout, lorsqu'il s'agit de *Vibrion septique*, de *Colibacille*, de *Bacille pyocyanique*, de *Staphylocoque doré*, de la possibilité de l'envahissement cadavérique dont il sera parlé plus loin.

EXPÉRIMENTATION SUR L'HOMME

C'est là un sujet des plus délicat dont il est nécessaire cependant, dans un ouvrage comme celui-ci, de dire quelques mots. Dans un tel cas, il ne faut jamais se départir de la plus grande prudence et ne pas se laisser guider seulement par des idées générales, voire même des résultats déjà acquis. Nous savons en effet quelle grande importance ont les *prédispositions individuelles* dans ces questions d'infection. Si Bochefontaine, Pettenkoffer ont pu avaler impunément des selles ou des cultures cholériques, on a malheureusement des exemples de choléra mortel contracté au laboratoire, dans un but d'expérimentation.

L'observateur consciencieux doit se faire une règle d'opérer sur lui-même. Aussi tiendra-t-il pour un véritable cas de conscience d'accepter des dévouements proposés ; il devra même toujours tempérer des ardeurs d'aides trop courageux ou surtout trop dévoués, facilement portés à se sacrifier.

C'est ici encore l'occasion de dire que bien de ces recherches et de ces manipulations sont dangereuses et qu'il ne faut *jamais rien omettre* des précautions voulues pour éviter tout risque ; les accidents arrivent toujours trop vite. Il faut constamment avoir en vue la possibilité de la dissémination des germes virulents dans le laboratoire, germes qui peuvent être surtout dangereux pour des organismes affaiblis ou prédisposés. On connaît des cas certains de contagion de tuberculose et de morve dans des laboratoires où l'on étudiait les microbes de ces affections. Les accidents désastreux occasionnés par les cultures du *Bacille pesteux* sont encore présents à toutes les mémoires. Avec la tuberculose, le tétanos, la morve, la diphtérie, le charbon, certaines septicémies, la peste sont particulièrement dangereux. Lorsqu'on manipule de tels virus, les précautions doivent être doublées, je ne crains pas de dire *exagérées*. Il est inutile d'aller grossir une liste obituaire déjà certainement trop chargée.

Aussi, les cultures virulentes qui ne servent plus, même celles affaiblies, les produits pathologiques virulents, les instruments et objets souillés doivent être soumis *aussitôt que possible* à une stérilisation sûre. C'est une marche à suivre dont il ne faut *jamais* se départir. La désinfection des mains, des autres parties du corps ou des vêtements qui peuvent être accidentellement souillées, est aussi de la plus haute importance au même point de vue.

IV. — PRÉPARATIONS ET ÉTUDE MICROSCOPIQUES

L'étude des Bactéries au microscope présente souvent à surmonter des difficultés assez grandes provenant des objets à examiner d'abord, de très petite taille et de faible réfringence, puis de l'emploi nécessaire de forts grossissements, qui en est une conséquence. Aussi ne doit-on pas s'étonner du peu de progrès qu'a fait pendant longtemps la connaissance de ces êtres, alors que la technique scientifique n'était pas à même de résoudre ces difficultés.

C'est surtout depuis l'emploi des matières colorantes en Bactériologie qu'il a été permis de scruter plus à fond la structure de ces Bactéries et d'en constater la présence là où l'on n'avait fait que les soupçonner et même où elles avaient été niées.

EXAMEN A L'ÉTAT VIVANT

L'examen des Bactéries vivantes, sans l'emploi d'aucun réactif, bien qu'il doive toujours être complété par des procédés suivants, fournira des renseignements de première importance que ne pourront donner les méthodes les plus compliquées. Aussi doit-il être pratiqué dans tous les cas. C'est le seul moyen d'observer les mouvements des espèces qui en présentent et la coloration que peuvent offrir les cellules isolées ou réunies en masse, particularités qui disparaissent ou se modifient sous l'influence de réactifs : de se rendre un compte exact de la forme, des dimensions, de l'aspect des différentes parties dont les rapports changent plus ou moins suivant les manipulations qu'on leur fait subir. Aux autopsies, on ne doit jamais négliger d'examiner de cette façon une gouttelette de sang : ce simple examen peut donner des indications précieuses.

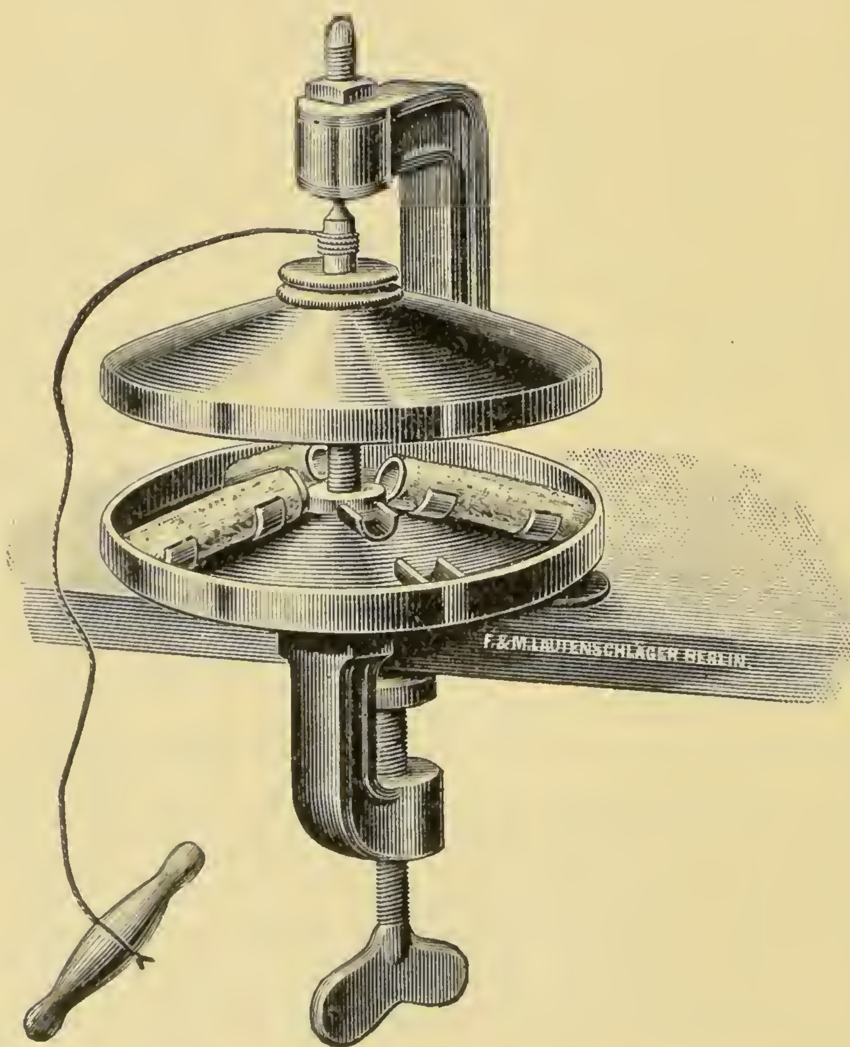


Fig. 178. — Centrifugeur de Gärtner (petit modèle).

La marche à suivre est du reste des plus simple.

Si les Bactéries à examiner sont en suspension dans un liquide, il suffit souvent d'en déposer une goutte sur un porte-objet et de recouvrir avec une lamelle. Lames et lamelles doivent être très nettes, pour ne pas apporter de causes d'erreur. Lorsqu'il y a très peu de Bactéries dans le liquide, on peut recourir à la sédimentation. Le liquide est abandonné au repos pendant plusieurs heures, jusqu'à vingt-quatre heures et plus, au besoin dans une glacière, puis, à l'aide d'une pipette, on prélève, pour faire l'examen, du dépôt constitué ou des couches inférieures du liquide. La sédimentation convient surtout pour les Bactéries immobiles ou peu mobiles; les espèces très mobiles ne se sédimentent pas. Pour faciliter la sédimentation, on peut ajouter l'alcool, en parties égales ou même plus; les Bactéries sont alors tuées, tout en gardant leurs propriétés de se colorer. La sédimentation est longue et difficile avec les liquides visqueux, crachats, pus, etc.; on la facilite beaucoup dans ce cas en traitant le liquide par un peu de potasse ou de soude pour le fluidifier.

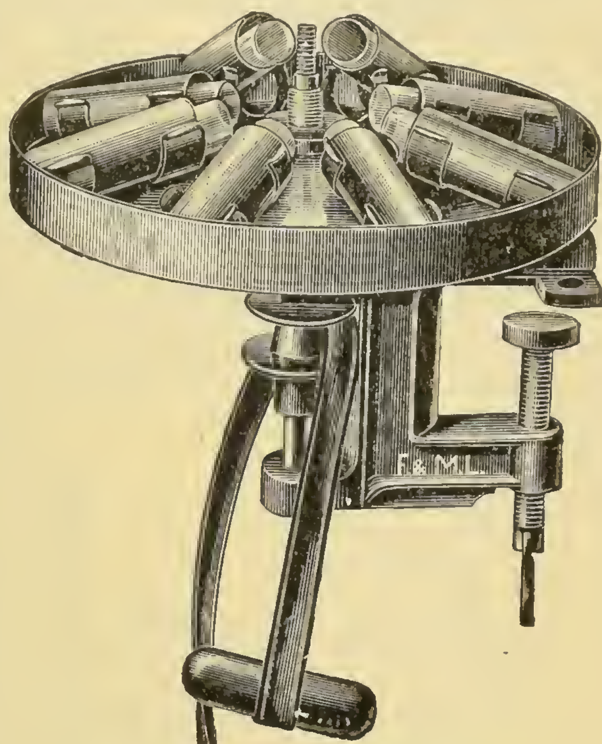


Fig. 179. — Centrifugeur « Rapid ».

L'emploi de la *centrifugation*, permettant de rassembler en un petit volume du liquide tous les corpuscules en suspension qui se condensent à la partie du vase employé la plus éloignée du centre d'action, rend de très grands services en laissant opérer presque instantanément et évitant les modifications et les troubles que peut occasionner une sédimentation prolongée et en donnant des résultats beaucoup plus complets au point de vue de la séparation des microbes de la masse liquide qui les contient.

Il existe de nombreux *appareils à centrifuger*, d'un usage pratique; les *centrifugeurs* de Gärtner, représentés figures 178, 179 et 180, sont d'un emploi courant; l'appareil représenté figure 181 donne particulièrement de bons résultats. On est souvent forcé de mettre en œuvre des appareils plus compliqués, obtenant jusqu'à trois et quatre mille tours à la minute, surtout lorsqu'on veut soumettre à la centrifugation des liquides sensiblement visqueux. Le *centrifugeur universel* de la maison Krauss, donnant de deux mille à trois mille tours par minute (fig. 182), et surtout le modèle à deux vitesses pouvant arriver jusqu'à douze mille tours à la minute, sont des plus recommandables. On peut les actionner par l'eau ou, mieux, l'électricité.

Lorsqu'on veut séparer des éléments de densité différente, leucocytes, globules rouges, microbes par exemple, on peut avoir intérêt à employer, pour centrifuger, des tubes de verre munis à leur partie inférieure d'une queue effilée assez longue. La séparation des différentes couches formées est rendue beaucoup plus facile.

Si les microbes forment des masses solides, on en détache une petite parcelle qui est délayée dans un liquide neutre, dépourvu de germes, eau ou bouillon stérilisés. Ces opérations se font très facilement avec le fil de platine emmanché qu'on recourbe à volonté à son extrémité et qu'on a grand soin de rougir à la flamme avant et après chaque contamination. Lorsqu'il y a suffisamment d'aliments dans le liquide employé, les Bactéries continuent à y vivre; on peut alors les observer pendant assez longtemps en empêchant la préparation de se dessécher. On le fait en

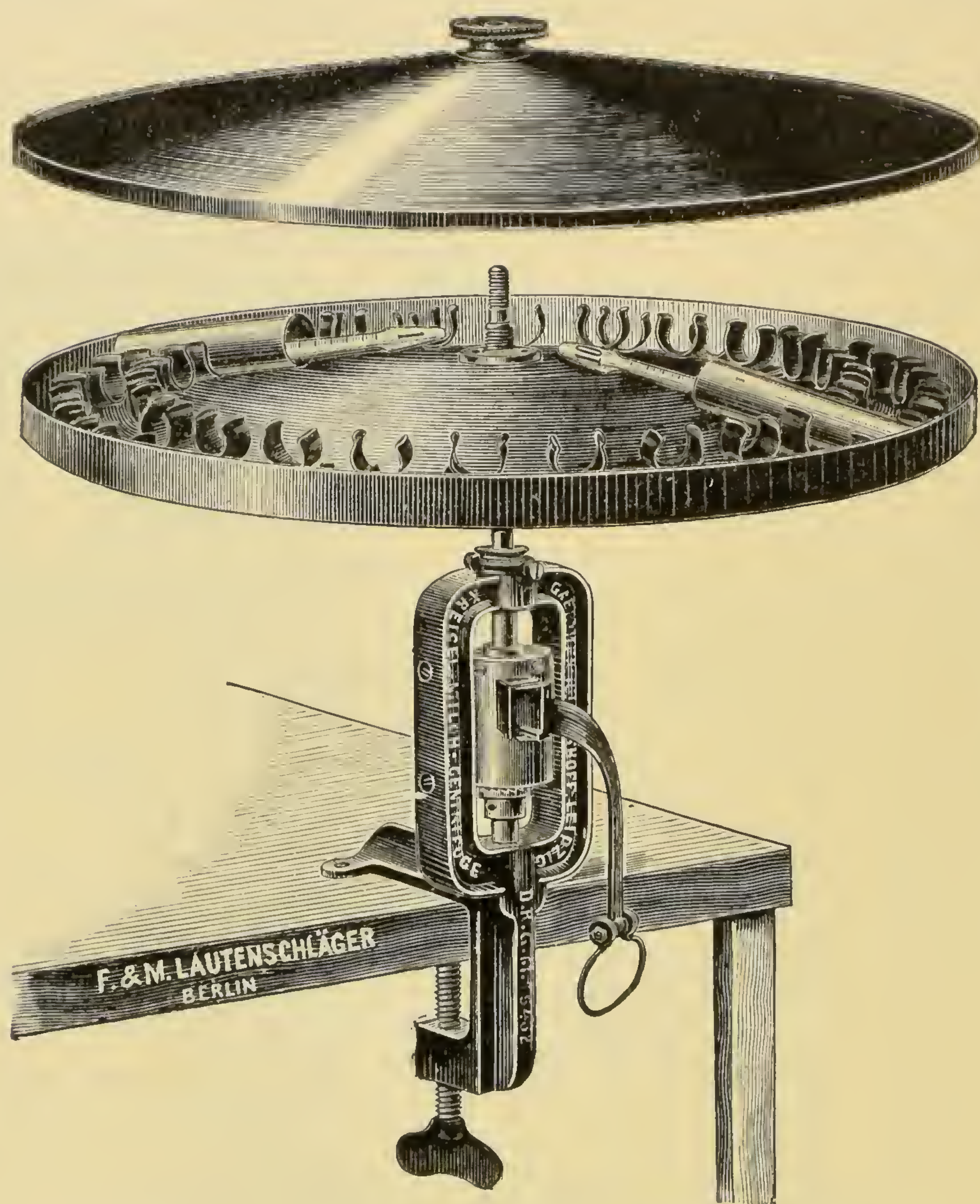


Fig. 180. — Centrifugeur de Gärtner (grand modèle).

lutant les bords de la lamelle à la paraffine ou en plaçant la préparation dans une chambre humide dont elle n'est sortie que par intervalles et seulement le temps nécessaire pour l'étudier. Le manque d'oxygène peut avoir une action défavorable, surtout chez les espèces qui en sont avides; on ne trouve bientôt de cellules vivantes qu'aux endroits où elles peuvent respirer, sur les bords de la lamelle surtout, ou autour des bulles d'air; si la préparation est lutée, l'asphyxie se produit vite partout. Lorsqu'on a affaire à des espèces peu exigeantes sous ce rapport, ou à plus forte raison à des anaérobies, on peut suivre pendant longtemps leurs phénomènes vitaux.

Il est préférable de recourir aux modes spéciaux de cultures sur porte-objet qui ont été décrits précédemment (p. 279), à l'aide desquels on pourra étudier, pendant tout le temps voulu, le développement, voir s'opérer de nombreuses divisions et les spores se former dans les cellules.

Des liquides neutres, n'exerçant aucune action sur les cellules, peuvent être employés au lieu et place de bouillon. Pour les Bactéries pathogènes, il peut être rationnel d'employer des liquides organiques, sérum, humeur aqueuse, liquides de ponction par exemple. L'emploi de la *solution physiologique* de 7 grammes de chlorure de sodium pour 1 000 grammes d'eau distillée, ou d'autres solutions isotoniques, est souvent à conseiller. La solution concentrée d'acétate de potasse rend dans ce cas d'excellents services. Elle ne contracte pas le protoplasma des Bactéries, ne change en rien leur forme, mais supprime presque toujours les mouvements lorsqu'ils existent. De plus, elle constitue un très bon liquide conservateur qui permet de transformer la pièce en préparation durable ; il n'est même pas nécessaire de luter de suite, la solution ne s'évaporant que très difficilement.

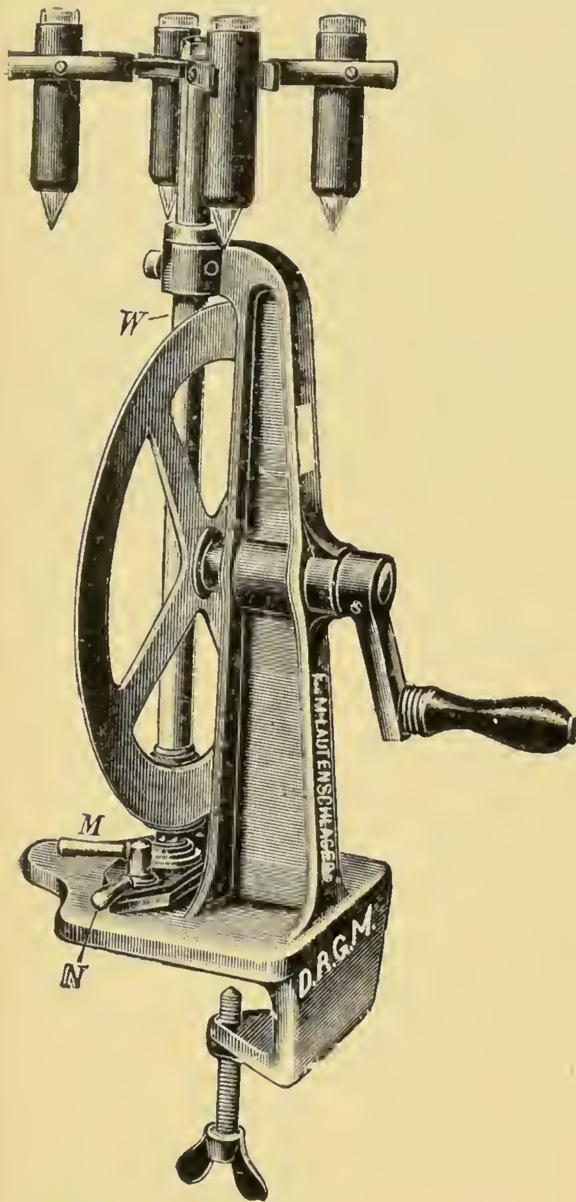


Fig. 181. — Centrifugeur à grande vitesse.

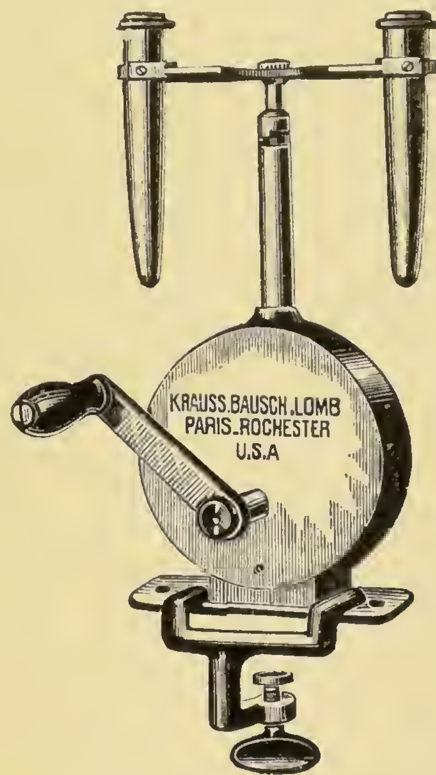


Fig. 182. — Centrifugeur universel à une seule vitesse.

Solution d'acétate de potasse.

Acétate de potasse pur	1 gramme.
Eau distillée	2 grammes.

Procédé à l'encre de Chine. — On mélange soigneusement sur la lame une gouttelette du liquide à examiner, liquide de culture, humeur, avec une goutte d'encre de Chine, et on laisse sécher. On examine à l'immersion à l'huile. Les Bactéries apparaissent brillantes sur fond noir (1).

L'emploi de solutions colorantes peu concentrées et inertes donne de très bons résultats. La plupart des espèces vivent très bien toute une journée dans les solutions faibles de fuchsine ou de violet de gentiane, dépourvues des moindres traces d'alcool. Une solution aqueuse assez forte de vert de méthyle est à recommander pour ces examens extemporanés ; elle aide à distinguer d'intéressants détails de la masse protoplasmique dont certaines portions sont bien plus avides que les autres de cette matière colorante, si prisée en histologie pour l'étude des formations nucléaires.

Le *rouge neutre* (*Neutralroth*) est un de ces *colorants vitaux* qui paraît donner les meilleurs résultats. Ehrlich (2) a signalé le premier sa propriété de colorer des éléments vivants dont certaines parties le fixent énergiquement. Plato et Himmel (3) ont signalé des particularités intéressantes de cette coloration spéciale qui paraît être due à la sécrétion de produits destinés à la défense cellulaire et ne se manifestant que pendant la vie de l'élément. Pour l'employer, on chauffe dans de l'eau distillée du rouge neutre en excès et on laisse refroidir ; 1 centimètre cube de cette solution saturée est mélangé à 100 centimètres cubes de solution physiologique.

Pour les espèces qui ne végètent bien qu'à une température assez élevée, l'usage des *platines chauffantes* devient très utile. On peut facilement laisser la préparation à demeure dans la platine qui est placée sur le microscope chaque fois qu'il est nécessaire. Dans les intervalles, elle se pose sur un support de même hauteur que la platine du microscope. Ces mêmes appareils servent aussi à étudier l'action des hautes températures sur les Bactéries. La *platine chauffante* de Ranvier et la *chambre chaude* de Vignal (p. 219) répondent à tous les besoins.

EXAMEN A L'AIDE DE RÉACTIFS

Les préparations, faites comme il vient d'être dit, sont loin de suffire à toutes les exigences. La transparence des Bactéries est souvent si grande qu'il est difficile, parfois même impossible, de les distinguer ; leur réfringence peu considérable se confond presque avec celle du liquide employé. Les contours sont alors d'autant moins nets que l'indice de réfraction du liquide est élevé ; assez visibles dans des liquides aqueux, ils deviennent difficiles à suivre dans des liquides visqueux plus réfringents, le sang, les liquides albumineux, les solutions sucrées concentrées, par exemple. Si, de plus, les Bactéries sont rares dans la

(1) Burri, Das Tuscheverfahren als einfacher Mittel zur Lösung einiger schwieriger Aufgaben der Bakterioscopie. Iéna, Fischer, 1909.

(2) Ehrlich, Ueber Neutralroth (*Allgem. med. Centralzeitung*, 1894, n° 2).

(3) Plato et Himmel, Le rouge neutre (*Neutralroth*) (*Ann. de l'Inst. Pasteur*, XVI 1902, p. 663).

préparation, l'œil n'étant attiré sur elles par aucun signe bien évident, la recherche en devient longue, difficile, voire même impossible. Si, au contraire, on les teint, d'une nuance éclatante sur le fond incolore ou coloré d'une autre teinte de façon à faire contraste, il devient très facile de les distinguer rapidement. Il en est de même lorsque les Bactéries sont noyées dans d'autres éléments, lorsqu'il s'agit, par exemple, d'en rechercher dans des tissus, où elles se trouvent incluses dans le corps protoplasmique ou réparties entre les éléments. On doit, en outre, ici, mettre à profit des méthodes spéciales de coloration qui permettent de fixer sur les Bactéries une matière colorante, tandis que le tissu lui-même, ou les éléments autres que ces parasites, sont colorés différemment.

Pour conserver aux éléments leur structure primitive et pour les soustraire à l'action souvent nuisible des liquides colorants et conservateurs, il est nécessaire de les *fixer* dans leur forme à l'aide de réactifs spéciaux, dont la manipulation est expliquée tout au long dans les manuels pratiques d'histologie. La *fixation*, la *coloration* et le *montage* des préparations sont les trois temps successifs de la méthode qui permet d'obtenir des préparations durables.

I. — Fixation des préparations.

RÉACTIFS FIXATEURS

L'emploi des réactifs de fixation varie suivant qu'on a à examiner des liquides ou des parties solides de tissus. Étudions d'abord le premier cas, nous passerons au second ensuite.

1° FIXATION PAR LA DESSICCATION SIMPLE

La *dessiccation* simple avait été recommandée, dès 1838, par Ehrenberg comme moyen de conservation et d'observation des organismes inférieurs. C'est en desséchant sur une lamelle de verre du liquide contenant des Bactéries ou des Infusoires qu'il est parvenu à découvrir certaines particularités fort intéressantes de leur structure, qu'il a aperçu, entre autres, les cils vibratiles, les *trompes*, suivant son expression, d'une grande espèce de Schizomycètes, son *Bacterium triloculare*, qui n'est pas encore rapporté jusqu'ici à une espèce connue. Le procédé est du reste appliqué avec succès en histologie pour certaines études délicates, en particulier celle du sang, ce qui en démontre la valeur. Koch (1) a perfectionné les détails en l'appliquant à l'étude spéciale des Bactéries; il en a fait voir, dans l'excellent article cité, les nombreux avantages et en a signalé les inconvénients, auxquels il est facile de remédier.

On dépose sur une lamelle *bien propre* une goutte du liquide contenant des Bactéries, ou d'un liquide privé de germes par une filtration rigoureuse et une stérilisation, dans lequel est délayée une partie de la culture prise au bout d'un fil de platine avec les précautions

(1) Koch, Untersuchungen über Bacterien, VI. Verfahren zum Conserviren und Photographiren der Bacterien (*Beitr. zur Biol. der Pflanzen*, vol. III, 3e p.), traduit dans *Revue intern. des sc.*, III, 1879, p. 55.

voulues. Plus le liquide est chargé de Bactéries, plus la goutte doit être petite; on a souvent alors avantage à la répartir en stries ou en couche mince sur la lamelle à l'aide d'un fil de platine. Pour cette opération et les suivantes, il est très commode de se servir de petites pinces dites *pinces de Cornet* (fig. 183), ou mieux de la *pince de Debrand* (fig. 184), beaucoup plus commode. La lamelle est desséchée avec soin sur une plaque métallique chauffée de 40° à 50°, ou au-dessus d'une flamme, en la maintenant assez haut pour que la température ne soit pas plus élevée; la face qui porte la goutte doit être tournée vers le haut. Dans les recherches qui nécessitent une précision absolue, il faut éviter d'exposer à la contamination par les poussières de l'air la face de la lamelle où est déposé le liquide: on la soumet à la chaleur modérée en tournant ce côté vers le bas, ou on la laisse pendant quelque temps dans un dessiccateur à acide sulfurique ou à chlorure de calcium, placée dans la même situation.

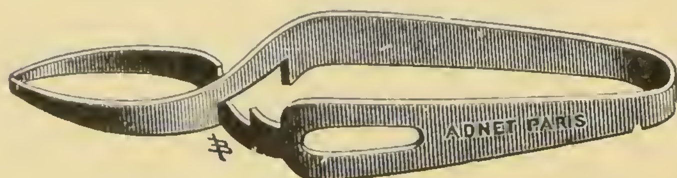


Fig. 183. — Pince de Cornet.

Lorsque la dessiccation est achevée, on peut traiter la préparation par des réactifs qui, employés au début, auraient donné de mauvais résultats en contractant le corps cellulaire ou en modifiant son aspect. De plus, les préparations sèches peuvent se conserver pendant longtemps telles quelles, sans s'altérer et sans qu'on ait à craindre de voir pénétrer et s'y développer des espèces étrangères, ce qui permet de faire, à un moment donné, une provision de lamelles qu'on n'utilisera que plus tard.

Par la dessiccation, la forme et l'aspect des Bactéries changent fort peu. Elles se dessèchent comme des corps rigides sans se rétracter; leur enveloppe gélatineuse les fixe à la lamelle et les empêche ainsi de se ratatiner. Il se produit cependant quelques modifications de forme; les colonies massives s'aplatissent, leurs éléments s'accolent dans un plan unique, ne montrent plus les rapports qui existaient entre eux; les espèces hélicoïdes, en s'aplatissant et s'accolant au verre, donnent une simple ligne ondulée. Pour remédier en grande partie à ces inconvénients, Koch conseille de se servir, comme liquide conservateur, de la solution concentrée d'acétate de potasse, qui gonfle légèrement la couche gélatineuse de la membrane et rend à la cellule ses dimensions primitives.

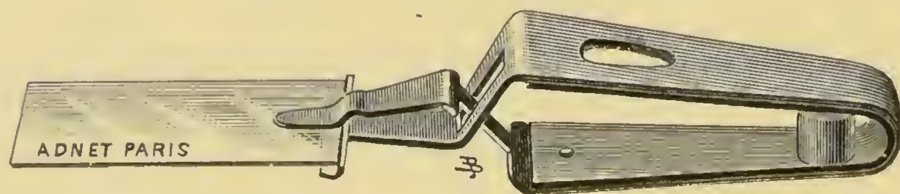


Fig. 184 — Pince de Debrand.

Il est chanceux de soumettre les lamelles ainsi préparées à l'action d'un liquide de lavage, et même d'une solution colorante aqueuse. La couche, obtenue en desséchant simplement la goutte de liquide, se gonfle en effet presque toujours très facilement par l'eau et se dissocie dans le liquide. En outre, lorsque le liquide évaporé contient des matières albuminoïdes ou des substances cristallisables, il se forme des précipités

qui troublent la préparation et cachent plus ou moins les Bactéries qu'on y cherche.

2° FIXATION PAR LA CHALEUR

C'est surtout pour remédier à ces deux défauts et pour faciliter l'action des agents de coloration que Koch a dû modifier sa méthode. Il a été conduit à employer comme agent de fixation la *chaleur de 120° à 130°*, très vantée déjà par Ehrlich (1) dans ses études sur les éléments du sang. Dans une série de recherches minutieuses, il a déterminé d'une façon précise les conditions de l'opération et surtout la durée pendant laquelle les préparations doivent subir l'action de la chaleur. Exposée un temps trop court à cette température, la pellicule obtenue se dissocie trop facilement au lavage; lorsque, au contraire, elle a été trop chauffée, les éléments sont altérés, diffluent ou se ratatinent, et surtout perdent l'importante propriété de fixer convenablement les matières colorantes.

On obtient facilement la température voulue en usant de l'étuve à air, réglée à 120°-130° au moyen d'un régulateur à mercure. On y arrive également en chauffant au bec Bunsen une plaque métallique assez épaisse; immédiatement au delà de l'endroit où une goutte d'eau projetée prend l'état sphéroïdal, la plaque a une température d'environ 120° (*caléfaction*).

La goutte de liquide déposée sur la lamelle, comme précédemment, est évaporée à une douce chaleur; puis le couvre-objet est placé, la face chargée tournée vers le haut, dans l'étuve ou sur la plaque chauffée. Le temps d'exposition à la chaleur varie avec le degré obtenu; la préparation doit rester cinq minutes environ de 120° à 130°, et de dix à quinze minutes à 110°.

Les recherches de Koch (2) lui ont fait adopter un procédé infiniment plus simple, pratique, tout en donnant d'aussi bons résultats. Il recommande, pour opérer la fixation parfaite de la couche obtenue par dessiccation sur la lamelle, de *passer trois fois dans la flamme d'un bec de Bunsen brûlant à bleu le couvre-objet à traiter, la face sur laquelle se trouve la couche de dessiccation tournée vers le haut.* L'exécution de cette opération demande un peu d'habitude, qui s'acquiert du reste bien vite en pratiquant. Le passage dans la flamme doit se faire avec une certaine lenteur, *comme si l'on coupait du pain*, disent les auteurs du procédé. A défaut de gaz, on peut employer la flamme d'une forte lampe à alcool. La réussite ou la non-réussite de certaines préparations profiteront plus que toutes les indications. Il faut naturellement avoir soin de tourner vers le haut la face de la lamelle sur laquelle se trouve la pellicule sèche, sans quoi les éléments atteints directement par la flamme seraient très vite complètement désorganisés. Il en est de même si la lamelle est soumise trop longtemps à la flamme et est conséquemment portée à une température trop haute. Si l'on ne chauffe pas assez, la couche se délitera trop facilement au lavage. En chauffant trop, on peut modifier profondément le corps cellulaire; la membrane et le pro-

(1) Ehrlich, Methodologische Beiträge zur Physiologie und Pathologie der verschiedenen Formen der Leukocyten (*Zeitschr. für klin. Med.*, I, p. 553).

(2) Koch, Die Aetiologie der Tuberculose (*Mitth. aus dem kaiserl. Gesundheitsamte*, I, 1887, p. 7).

toplasma deviennent diffluents, ils perdent le pouvoir de fixer les couleurs ; seules, les membranes très résistantes, celles des spores par exemple, peuvent garder leur aspect normal, quoique modifiées aussi, car elles se laissent imprégner par les solutions colorantes qui n'avaient auparavant aucune action sur elles. Nous saurons utiliser cette particularité en étudiant la coloration des spores.

Voici, en résumé, quelle est la marche à suivre pour obtenir la fixation convenable des Bactéries par ce procédé. Une goutte de liquide à examiner est déposée sur une lamelle couvre-objet très propre. Lorsqu'on a affaire à une substance visqueuse ou solide, des crachats ou une parcelle de culture, on en délaye très peu sur la lamelle dans une gouttelette d'eau pure, ou l'on écrase une petite portion entre deux lamelles qu'on sépare en les frottant l'une contre l'autre, de manière à étaler la substance en couche assez mince. Dans ces différents cas, la lamelle est soumise à la dessiccation à basse température, 40°-50°, soit sur une plaque tiède, soit en la maintenant assez loin au-dessus d'une flamme, à l'aide de pinces, à un niveau où la chaleur est douce. C'est seulement lorsque l'évaporation est complète que la lamelle est lentement passée dans la flamme, par trois fois, en ayant soin de ne mettre aucun temps d'arrêt dans chaque opération. Elle est alors suffisamment fixée ; on peut procéder sans crainte aux manipulations ultérieures, surtout faire agir les réactifs colorants.

Si l'on se sert d'une lame porte-objet au lieu de lamelle, il est nécessaire de ralentir un peu le passage dans la flamme, le verre plus épais transmettant moins vite le degré de chaleur nécessaire.

Les Bactéries qui ont ainsi subi l'action d'une telle chaleur sont, il faut en être prévenu, légèrement modifiées dans leurs formes et dans leurs dimensions. Il se produit une rétraction, un raccourcissement des éléments, peu important il est vrai, mais qui peut cependant être sensible quand il s'agit de mensurations rigoureuses de quantités aussi petites. Aussi doit-on poser en principe de ne jamais mesurer que les cellules vivantes, dans leur état normal, lorsqu'il s'agit de fixer les caractères d'une espèce et, ce qui résulte des mêmes considérations, de n'établir de comparaisons rigoureuses qu'entre des préparations obtenues d'après la même méthode. Il est même des espèces, le *Spirille de la fièvre récurrente*, par exemple, qui supportent très mal l'action de la chaleur ; il faut alors user de fixatifs chimiques.

Ce moyen de fixation ne peut guère être employé que pour les liquides. Il serait difficile, en effet, d'y soumettre des morceaux de tissus, qui s'altéreraient trop dans leur structure. Il faut, dans ce cas, recourir aux réactifs chimiques, qui sont, par contre, d'un emploi moins général pour fixer les Bactéries qui se trouvent dans les liquides.

3° FIXATION PAR LES RÉACTIFS CHIMIQUES

L'*acide osmique*, utilisé par Blanchard et Certes (1) pour l'étude d'autres organismes inférieurs, peut servir dans les cas où la chaleur ne rend pas la couche de dessiccation parfaitement adhérente à la lamelle,

(1) Certes, Sur l'analyse micrographique des eaux (*Assoc. franç. pour l'av. des sc., Congrès de la Rochelle*, 1882, p. 777).

mais seulement dans les cas où le liquide est peu riche en matières graisseuses et albuminoïdes. Une goutte d'une solution d'acide osmique à 1 ou 2 p. 100 sera mélangée sur la lamelle à une goutte du liquide à examiner, ou, mieux, une goutte de ce liquide sera évaporée sur la lamelle, puis le résidu soumis à l'action d'une solution osmiquée. L'acide osmique en vapeurs donne aussi de très bons résultats; Fischer (1) le recommande concurremment avec l'emploi d'iode en solution alcoolique. L'acide osmique se vend en tubes scellés de 1 gramme ou de un dixième de gramme. Il faut préserver ses solutions de la lumière et plus encore éviter soigneusement les poussières. Le mieux est de conserver l'acide osmique en flacons à l'émeri sous forme d'une solution à 2 p. 100 dans la solution d'acide chromique à 1 p. 100, selon le conseil de Bolles Lee et Henneguy. La même solution servira pour la fixation au moyen des vapeurs et aussi pour faire la liqueur de Flemming. Il est également nécessaire de se souvenir que les vapeurs sont irritantes et parfois provoquent des conjonctivites.

L'*acide chromique* et les *chromates* alcalins, si employés autrefois, présentent tant d'inconvénients qu'ils ne doivent plus servir à fixer qu'exceptionnellement. On donne maintenant la préférence à l'un ou l'autre des deux fixateurs suivants.

Le *mélange chromo-acéto-osmique de Flemming* (mélange fort) est très à recommander comme fixateur des tissus, d'autant plus qu'il n'empêche pas la coloration subséquente des Bactéries. Il se prépare ainsi, d'après Bolles Lee et Henneguy : on fait et l'on conserve à part : *a*) une solution contenant : acide chromique à 1 p. 100, 11 parties ; eau, 4 parties ; acide acétique, 1 partie, et *b*) une solution d'acide osmique à 2 p. 100 dans l'acide chromique à 1 p. 100. Pour faire le liquide définitif, on mêle 4 parties de *a* avec une partie de *b* ; il est préférable de ne faire le mélange qu'au moment du besoin. On fixe de très petits fragments par une immersion de une heure à vingt-quatre heures de durée, on lave ensuite à l'eau courante pendant le même temps, puis successivement aux alcools à 70°, 80°, 90°. Après cette fixation, les diverses méthodes de colorations à la *safranine O* (*Wasserlöslich*) sont les plus recommandables.

Le *sublimé* en solution aqueuse saturée est également un fixateur de premier ordre, pourvu qu'on ne le laisse agir que le temps voulu et qu'on l'éloigne ensuite rapidement et complètement par des lavages successifs dans les alcools à 70°, 80°, 90°, auxquels on ajoute de la teinture d'iode jusqu'à ce que les objets ne décolorent plus le mélange. On fixe avec le sublimé des fragments dont le diamètre ne dépasse pas un tiers de centimètre, en une demi-heure à vingt-quatre heures. Le meilleur mode de préparation est de dissoudre en chauffant 75 grammes de sublimé dans 1 000 grammes d'eau. Quand le fond du vase refroidi se tapisse d'aiguilles cristallines blanches, le liquide peut seulement être considéré comme saturé. La solution dans l'eau, à 3 p. 100, donne également de très bons résultats ; les lamelles préparées sont soumises à son action pendant vingt à trente

(1) Fischer, Untersuchungen über Bakterien (*Jahrb. für wiss. Bot.*, XXVII, 1894).

minutes, puis lavées à très grande eau ou comme il vient d'être indiqué.

Schaudinn vante le *sublimé alcoolique* (solution aqueuse saturée de sublimé, 2 parties; alcool absolu, 1 partie). Laisser la lamelle de douze à vingt-quatre heures; elle doit d'abord flotter, la face enduite en dessous; plus tard, on peut l'immerger.

L'*alcool absolu* durcit bien, mais conserve mal les structures. Il a cependant l'avantage, sur les deux méthodes précédentes, de la rapidité et de la facilité. Kühne en conseille l'usage pour fixer les tissus qu'on doit couper au microtome à congélation. Koch s'en est surtout servi pour fixer des liquides. Les lamelles munies de la couche mince obtenue par évaporation du liquide sont placées dans un bain d'alcool absolu pendant un temps variable (deux ou trois jours) jusqu'à coagulation parfaite et adhérence complète au verre. C'est l'appréciation de ce temps qui est le point le plus délicat de cette méthode. Il faut soumettre en même temps au réactif plusieurs préparations pour apprécier ainsi, par tâtonnements, l'état de la pellicule. Après ce procédé de fixation, on obtient de belles colorations, surtout au point de vue de leur uniformité.

On peut employer de la même façon un *mélange à parties égales d'alcool absolu et d'éther* ou d'*alcool absolu* additionné, suivant le cas, d'un *sixième ou d'un tiers d'a étone*, préférable suivant Nicolle (1).

Comme conclusions, pour les liquides, employer couramment la fixation par le chauffage dans la flamme bleue d'un bec de Bunsen, puis encore l'alcool-éther qui déformera moins; pour les tissus, employer, comme méthode rapide, la fixation à l'alcool et, comme méthode délicate de recherches, la fixation soit au liquide de Flemming, soit au sublimé, suivant les cas, et l'expérience personnelle aussi.

II. — Coloration des préparations.

RÉACTIFS COLORANTS

Les Bactéries, déjà si pâles dans l'eau ou les liquides peu denses, se distinguent moins bien encore dans les milieux employés à la confection des préparations, dont la réfringence est égale à celle de leur corps cellulaire ou s'en approche. Sur de telles préparations, les contours paraissent parfois si peu nets, même à l'aide de forts objectifs, qu'il devient difficile de se rendre un compte exact des formes et des dimensions réelles de ces objets; le dessin en est difficile et la photographie souvent impossible. L'usage de substances colorantes a considérablement facilité ces recherches; aussi a-t-on à signaler de grands progrès dans l'étude de ces êtres inférieurs depuis l'emploi judicieux des méthodes de coloration.

1° COLORATION PAR L'IODE

L'*iode*, qui teint si facilement en jaune les différentes parties de la

(1) Nicolle, Pratique des colorations microbiennes (*Ann. de l'Inst. Pasteur*, VIII, 1895, p. 664).

cellule et en particulier le protoplasme, a été un des premiers réactifs de coloration employés. On peut s'adresser soit à l'eau iodée, soit à la teinture d'iode faible, à une solution iodo-iodurée ou au chlorure de zinc iodé, si employé dans les recherches d'anatomie végétale et donnant de très bons résultats. L'importance de ce réactif est toute spéciale quand les Bactéries contiennent de la matière cellulosique ou amylacée, qu'il peut colorer en bleu violet par formation d'iodure d'amidon ; c'est ce qu'on observe à certaines phases du développement de plusieurs espèces, dont *Bacillus butyricus*, *Leptothrix buccalis*, *Sarcina ventriculi*.

2° COLORATION PAR LE CARMIN

Les préparations de *carmin* (p. 390) ont servi, sans réussir cependant beaucoup. D'après Weigert (1), très bonnes pour la coloration des *Micrococcus*, elles sont à laisser de côté complètement pour celle des autres Bactéries. Elles servent plus pour les tissus.

3° COLORATION PAR L'HÉMATOXYLINE

C'est également ce dernier auteur qui a recommandé l'*hématoxyline*, plus spécialement réservée pour teindre les tissus dans les doubles colorations (p. 389). L'*extrait de bois de campêche* a servi à Koch à rendre visibles les cils vibratiles de plusieurs espèces, et est employé par Lœffler comme mordant pour arriver au même but.

4° COLORATION PAR LES COULEURS D'ANILINE

Les véritables colorants des Bactéries sont les *couleurs d'aniline*.

Ces matières dérivées de la houille, indiquées comme très bonnes par Weigert (2), furent surtout vulgarisées par Koch (3). Ehrlich (4) les classe en *couleurs basiques* et *couleurs acides*. Les couleurs basiques, ou couleurs dans lesquelles la substance colorante joue le rôle de base combinée avec un acide incolore, possèdent en général une tendance à se localiser d'elles-mêmes et directement dans les noyaux, tandis que les couleurs acides, ou couleurs dans lesquelles la substance colorante proprement dite joue le rôle d'un acide dans la combinaison, colorent d'une manière diffuse, ou se localisent principalement dans le cytoplasma et les substances intercellulaires.

Ces deux catégories, couleurs basiques, couleurs acides, ne correspondent pas exactement aux catégories techniques de colorants *nucléaires* et colorants *plasmatiques*. Vis-à-vis de ces couleurs, les Bactéries se comportent comme des noyaux.

Sont classées dans les couleurs *basiques* : la fuchsine, l'auramine, la chrysoïdine, la vésuvine (brun de Bismarck), le vert brillant, le vert malachite, le violet de méthyle, le violet de dahlia, le bleu Victoria, la safranine, le bleu de méthylène, le vert de méthyle, le violet de gentiane, la thionine.

(1) Weigert, Ueber Bakterien in der Pockenhaut (*Centralbl. für die med. Wissensch.*, 1881, n° 49).

(2) Weigert, Zur Technik der mikroskopischen Bakterien-Untersuchungen (*Virchow's Arch.*, Bd LXXXIV, p. 275).

(3) Koch, Untersuchungen über Bacterien (*Cohn's Beitr. zur Biol. der Pflanzen*, III, et *passim* dans ses autres mémoires).

(4) Ehrlich, *Verhandl. der Berlin. phys. Gesellschaft*, 16 mai 1879. — Et : *Arch. für Anat. und Physiol.*, 1879, p. 571).

Dans les couleurs *acides* : la fuchsine S, le violet S, les éosines, les fluorescéines, l'orange G, le vert lumière (Lichtgrün FS), l'acide picrique, le picrate d'ammoniaque, l'induline (nigrosine).

C'est donc aux matières colorantes de la première sorte qu'on aura à s'adresser, surtout pour les colorations journalières.

1°. *Solutions colorantes simples.*

La coloration s'obtient d'ordinaire à l'aide de solutions aqueuses. L'emploi direct des solutions alcooliques est à rejeter, sauf cependant dans les cas où elles sont d'une absolue nécessité, à cause de l'intensité et surtout de l'uniformité des colorations qu'elles fournissent : les premières, on le sait bien en histologie, ont une élection bien plus marquée. La plupart des matières colorantes employées sont solubles dans l'eau ; mais les solutions aqueuses présentent le grave inconvénient de mal se conserver, de ne pas s'opposer suffisamment au développement des Bactéries dans leur intérieur. D'où une cause d'erreur qu'il peut être fort important d'éviter. Il est à recommander de n'employer que des bains préparés extemporanément en ajoutant à la quantité d'*eau bien pure* nécessaire quelques gouttes d'une solution alcoolique concentrée, obtenue en saturant avec la couleur de l'alcool à 95° ou de l'alcool absolu. On obtient de cette façon des solutions de conservation irréprochable et d'usage très commode. Pour préparer le bain, il faut se servir d'eau récemment distillée ou d'eau filtrée que l'on conserve soigneusement, dans des vases stérilisés et bien bouchés, à l'abri de la contamination de l'air. L'eau qui sert à enlever l'excès de solution colorante, au *lavage* de la préparation, peut être de l'eau ordinaire ; si elle dépose des Bactéries étrangères sur la lamelle, celles-ci se reconnaîtront facilement par l'absence de coloration.

Ce n'est pas une précaution inutile de prendre de l'*eau distillée* pour faire les bains colorants. L'eau calcaire, par exemple, est contraire à certains colorants, la fuchsine, les verts, certains bleus ; la chaux précipite la base de ces colorants en grumeaux poisseux qui peuvent beaucoup gêner ou induire en erreur dans les préparations.

Pour les couleurs insolubles dans l'eau, il faut naturellement avoir recours à des solutions dans l'alcool ou d'autres véhicules.

Lorsqu'on fait usage de solutions alcooliques de colorants, il est inutile de fixer d'avance la préparation par l'un ou l'autre des moyens usités, l'alcool du bain colorant faisant office de fixateur.

La coloration se fait souvent à froid ; mais, quand on veut fixer surtout le colorant sur des éléments qui doivent être soumis à une décoloration énergique et conserver néanmoins leur couleur, tandis que d'autres, voisins, se décolorent, ou qu'on a affaire à des Bactéries qui se colorent mal, on obtient souvent d'excellents résultats en chauffant le colorant vers 50°. On y arrive aisément, à simple vue, en tenant quelques secondes à distance d'une flamme le verre de montre ou la capsule contenant le liquide préparé.

1° **Rouges**. — La *fuchsine* (*Fuchsin für Bacillenfarbung* de Grübler) donne des colorations vives et durables. Les diverses *fuchsines basiques* commerciales paraissent également utilisables. On les distingue sous les

noms de *Fuchsine*, *Rubine*, *Magenta*, *Anilinroth*, *Roséine*, selon les fabriques.

Certaines sont franchement rouges, d'autres légèrement violettes : les premières sont préférables pour obtenir des contrastes bien nets dans les doubles colorations avec le bleu de méthylène.

Il ne faut pas confondre ces couleurs avec les *fuchsines acides* : Fuchsine S, Säurefuchsin (Weigert), Rubin S, Saurerubin, Acid Magenta. Celles-ci ont des indications bien différentes.

Le *rouge neutre* (*Neutralroth*), *chlorhydrate de diméthyldiamido-toluphénacétine*, est d'un emploi tout spécial. Il a peu ou pas d'affinité pour les microbes vivants, plus pour les microbes morts, surtout pour ceux qui sont phagocytés (1). On l'emploie en solution aqueuse (Voy. p. 364).

Comme autres colorants rouges répondant à des besoins spéciaux, nous citerons : les *éosines solubles dans l'eau*; le *rouge Congo*, une des couleurs les mieux tolérées par les cellules vivantes, parfois utile pour démontrer la présence d'acide libre, mais malheureusement se conservant mal ; l'*érythrosine*, qui, ainsi que l'éosine, peut très facilement servir à transformer les plaques photographiques ordinaires au gélatino-bromure en plaques orthochromatiques ; enfin et surtout ces colorants nucléaires si électifs et si solides, la *Phénosafranine* et la *Safranine SO* (*Wasserlöslich* de Grübler).

2° **Violets**. — Le *violet de gentiane*, le *violet dahlia*, la *thionine*, le *violet de méthyle 5B et 6B*, *hexaméthylviolet*, *Krystallviolet* sont tout aussi recommandables pour un usage journalier comme beauté et comme durée que les fuchsines basiques. Ils possèdent même, à l'encontre de la fuchsine et du bleu de méthylène, la propriété d'être fixés par l'iode sur certains microbes au point de permettre une décoloration ultérieure d'autres éléments par des agents d'extraction énergiques.

3° **Bleus**. — Le plus utilisé est le *Bleu de méthylène*, très vanté par Ehrlich (2) et par Kühne. A la longue, cependant, il se décolore. De plus, la coloration n'est pas très intense. Pour des études fines de morphologie, c'est, avec le vert de méthyle, le réactif capable de rendre le plus de services, si on le choisit bien pur, par exemple le bleu recommandé par Ehrlich (*Methylen Blau-Reactif zu Injectionen in vitale Gewebe* du Dr Grübler) ou encore celui recommandé par Apathy [*Medicinische Methylenblau chemisch rein und chlorinzkfrei* de Merck (de Darmstadt)].

Ce bleu colore en violet les *Plasmazellen* et, d'après Babès, en rouge certains éléments à l'intérieur de divers microbes dont le corps se teint en bleu (corpuscules métachromatiques, p. 28).

Le *Bleu Victoria*, colorant basique, peut être avantageusement associé à la Fuchsine S.

(1) Plato et Himmel, Le rouge neutre (*Ann. de l'Inst. Pasteur*, XVI, 1902, p. 663). — Ueber die vitale Färbbarkeit der Phagocyten des Menschen und einiger Saügethiere mit Neutralroth (*Arch. für mikrosc. Anat.*, LVI). — Plato et Guth, Ueber den Nachweis feinerer Wachsthumsvorgänge in Trichophyton und anderen Fadenpilzen mittels Neutralroth (*Zeitschr. für Hygiene*, XXXVIII, 1901, p. 319).

(2) Ehrlich, Technik des Bacterien-Untersuchung (*Zeitschr. für klin. Med.*, I et II).

Le *Bleu de toluidine* donne d'excellents résultats en solution aqueuse.

Giemsa et Marino ont introduit l'usage du *Bleu azur*, ou *Azur de méthylène*, en solution dans l'alcool méthylique, précieux pour l'étude de quelques Bactéries et surtout de Protozoaires. Il est principalement employé, pour double coloration, avec l'éosine (Voy. p. 388).

4° **Bruns et Orange**. — Le *Brun de Bismarck* (Vésuvine, *Phenylenbraun*, *Manchesterbraun*, *Anilinbraun*), introduit par Koch (1) dans la technique bactériologique, est utile pour les préparations à monter dans la glycérine et a rendu des services pour la photographie; actuellement on photographie facilement les rouges et les violets avec les plaques isochromatiques (p. 196). C'est une couleur basique, utilisée, de même que le bleu de méthylène et la fuchsine acide, comme *colorant vital*.

L'*Orange G*, couleur acide, est capable de fournir de beaux contrastes comme l'éosine et le vert lumière.

5° **Verts**. — On emploie le *vert lumière* et le *vert de méthyle*. Le *vert lumière* (*Lichtgrün FS* ou *Sauregrün*) est un colorant acide, utilisable pour décolorer une préparation tout en colorant le fond, tandis que le *vert de méthyle* est un colorant nucléaire extrêmement précieux pour les détails de structure des grandes espèces.

Malheureusement, ces verts ne sont pas très stables.

Dans la recherche des Bactéries dans les tissus, Kühne l'emploie en solution dans l'huile d'aniline pure. Guignard s'est avantageusement servi d'un mélange de vert de méthyle OO avec la Fuchsine S.

6° **Noirs**. — Ces couleurs sont d'un emploi très restreint. Künstler (2) recommande le *Noir Colin* pour la coloration des cils vibratiles des Spirilles.

L'*Induline*, probablement identique à la *Nigrosine* (*Wasserlöslich*), est un colorant basique d'un beau contraste avec les rouges et, de plus, est précieuse pour marquer les limites cellulaires et différencier le mucus de la fibrine.

Comme ces couleurs d'aniline ne constituent pas toutes des composés chimiques bien définis (ex. le *Kernschwarz*, etc.), qu'elles varient absolument selon leur mode de fabrication, que ces procédés de fabrique même changent continuellement, les résultats peuvent être fort dissemblables. Un auteur sérieux doit toujours (à l'exemple de Kühne) en indiquer exactement la marque, la provenance, pour qu'on puisse s'y conformer. On peut se procurer de bons colorants chez le Dr Grübler (Leipzig, Bayersche Strasse, 63), Carl Zeiss, à Berlin, ou le Dr G. Münder (Göttingen).

Les solutions aqueuses ne suffisent pas à colorer certaines espèces qui ne se laissent que difficilement imprégner par la substance colorante.

(1) Koch, Untersuchungen über Bacterien (*Beitr. zur Biol. der Pflanzen*, III, 3e p., p. 55).

(2) Kunstler, Contributions à la technique des Bactériacées (*C. R. de l'Acad. des sc.*, t. CV, 1887, p. 689).

Lorsqu'on fait agir, avant la coloration ou concurremment à elle, certains réactifs qui semblent diminuer la résistance de la membrane, on parvient à obtenir de meilleurs résultats. Les alcalis réussissent tout particulièrement dans ce cas; on simplifie beaucoup la technique en les ajoutant directement au bain colorant, dont ils exaltent considérablement la puissance. Dans des cas spéciaux, on a obtenu d'excellents résultats de certaines substances qui jouent probablement le rôle de mordant; le tannate de fer, l'extrait de bois de campêche, ont été employés dans ce but par Lœffler. Ohlmacher (1) recommande également le formol à 4 p. 100, soit dans le colorant, soit avant. Des mélanges de différentes couleurs donnent aussi parfois d'excellents résultats. On verra plus loin l'exposition des méthodes spéciales à appliquer à la coloration des espèces qui se décolorent par la méthode de Gram (p. 379).

2° *Solutions colorantes composées.*

Elles sont formées, soit de plusieurs matières colorantes en mélange, soit de colorants, additionnés de produits qui agissent comme *mordants*, favorisant la fixation de la couleur sur les éléments. Parmi ces derniers produits, s'emploient surtout les alcalis, l'aniline, l'acide phénique, le sublimé, le tannin, l'iode.

Gram a beaucoup préconisé l'*iode* comme mordant; comme ici l'emploi de l'iode est toujours uni à l'action décolorante de l'alcool, nous retrouverons plus loin sa méthode de coloration.

Ehrlich met en première ligne, comme mordant, *l'eau aninilée* (p. 376). Sahli (2) prend une *solution de borax* à 1 gramme pour 60 d'eau. Babès (3) a remplacé l'aniline par la *toluidine*. Aucune de ces modifications n'a prévalu sur le procédé primitif d'Ehrlich.

Koch (4) a préconisé l'usage des *solutions alcalines*; elles l'ont conduit à la découverte du *Bacille de la tuberculose*. Il employait le mélange suivant :

Solution alcaline de Koch.

Solution alcoolique concentrée de bleu de méthylène.	1 volume.
Solution de potasse à 10 p. 100	2 volumes.
Eau distillée	200 —

Le liquide doit être filtré avant l'usage; il s'altère vite et ne peut, conséquemment, servir plusieurs jours.

Lœffler (5) recommande la formule suivante, qui s'altère vite aussi, mais est plus facile à préparer extemporanément :

Solution alcaline de Lœffler.

Solution alcoolique concentrée de bleu de méthylène.	1 volume.
Solution de potasse à 1 p. 10 000	2 volumes.

La puissance colorante de ces solutions alcalines est considérable.

(1) OHLMACHER, *Med. News*, 16 février 1895.

(2) SAHLI, *Zeitschr. für wiss. Mikrosk.*, II, 1885.

(3) BABÈS, Étude sur les Bactéries de la lèpre et de la tuberculose (*C. R. de l'Acad. des sc.*, 1883).

(4) KOCH, Die Aetiologie der Tuberculose (*Berl. klin. Wochenschr.*, 1882).

(5) LŒFFLER, Untersuchung über die Bedeutung der Microorg. für die Entstehung der Diphterie (*Mitth. aus dem kaiserl. Gesundheitsamte*, II, 1884).

Elles ont cependant de graves inconvénients : elles gonflent par trop certaines préparations et peuvent arriver à détacher des lamelles la mince couche obtenue par dessiccation des liquides, ceux riches en albumine surtout ; enfin, elles altèrent souvent les éléments histologiques délicats. Aussi sont-elles réservées dans la pratique pour des cas spéciaux et remplacées par l'*eau anilinée*, indiquée par Ehrlich (1) et en grande faveur depuis près des bactériologistes. Elle se prépare en ajoutant à de l'eau distillée une petite quantité d'aniline pure (huile d'aniline, phénylamine), assez peu soluble dans l'eau, puisqu'à 12° une partie d'aniline exige trente et une parties d'eau pour se dissoudre. Pour 100 centimètres cubes d'eau distillée, 3 grammes d'aniline suffisent. On agite fortement et l'on passe sur un filtre mouillé qui retient les gouttelettes non dissoutes. La liqueur brunit vite à l'air, l'aniline se résinifiant facilement ; il faut alors la rejeter. Il est toujours préférable de la préparer au moment de l'utiliser en ajoutant, dans un tube à essai, quelques gouttes d'aniline à une petite quantité d'eau distillée et en filtrant sur un papier mouillé. Les résultats obtenus avec les solutions fraîches sont bien plus complets.

Solution anilinée d'Ehrlich.

Eau anilinée	10 centimètres cubes.
Solution alcoolique saturée de violet de gentiane	1 centimètre cube.

Le violet de gentiane peut être remplacé par le violet 5B, la fuchsine, la thionine ou le bleu de méthylène.

L'*eau anilinée*, colorée à l'aide d'une solution concentrée de fuchsine, de violet, de thionine ou de bleu, s'emploie la plupart du temps à chaud ; c'est une manière de renforcer encore son action. On fait chauffer dans un tube à essai ou dans un verre de montre une dizaine de centimètres cubes d'eau anilinée à laquelle on a ajouté de 4 à 6 gouttes de solution alcoolique concentrée de matière colorante, jusqu'à ce qu'il se dégage des vapeurs; on y place alors les objets à colorer.

Fraenkel (2) prépare une *eau anilinée* de conservation assez satisfaisante en ajoutant une petite proportion d'alcool. Il dissout 3 centimètres cubes d'aniline dans 7 centimètres cubes d'alcool absolu et complète avec 90 centimètres cubes d'eau distillée. On s'en sert comme de l'eau anilinée ordinaire.

Weigert (3) a proposé l'*ammoniaque* comme mordant :

Solution de Weigert.

Ammoniaque liquide	0gr,50
Alcool absolu	10 grammes.
Eau	100 —

Ajouter quantité suffisante de violet ou de fuchsine.

(1) Ehrlich, *Deutsche med. Wochenschr.*, 1882, n° 19.

(2) Fraenkel, Ueber die Färbung der Koch'schen Bacillus (*Deutsche med. Wochenschr.*, 1880, n° 13).

(3) Weigert, *Deutsche med. Wochenschr.*, 1888, p. 351.

Ziehl (1) recommande l'*acide phénique* avec la fuchsine donnant le *Rouge de Ziehl* :

Solution de Ziehl (recommandée).

Fuchsine rubine	1 gramme.
Acide phénique neigeux	5 grammes.
Alcool absolu	10 —
Eau distillée	100 —

Triturer dans un petit mortier de verre la fuchsine et l'alcool; ajouter l'acide phénique, mélanger ; ajouter par petites portions, en continuant de remuer, les deux tiers de l'eau ; verser dans un flacon, rincer le mortier avec le reste de l'eau ; réunir les liquides. Laisser en contact vingt-quatre heures ; filtrer dans un flacon propre bouché à l'émeri.

Cette solution donne d'excellents résultats.

La *thionine phéniquée*, préconisée par Nicolle (2), est un colorant de out premier choix donnant des colorations plus fines, plus électives, que les autres violets.

Solution de thionine phéniquée (recommandée).

Thionine	1 gramme.
Acide phénique neigeux	5 grammes.
Alcool à 95°	10 —
Eau distillée	100 —

Préparer comme pour la solution de Ziehl.

Formule plus simple.

Solution saturée de thionine dans l'alcool à 90°.	10 centimètres cubes.
Eau phéniquée à 1 p. 100	100 — —

Les formules suivantes donnent aussi de bons résultats :

Bleu de toluidine.

Bleu de toluidine	0gr,5
Eau phéniquée à 2 p. 100	100 grammes.
Alcool à 90°.	10 —

Bleu de Kühne.

Bleu de méthylène	1gr,5
Alcool absolu	10 grammes.
Eau phéniquée à 5 p. 100	100 —

Bleu polychromatique de Unna.

Bleu de Unna (3)	1 partie.
Eau phéniquée à 5 p. 100	1 —
Eau distillée	3 parties.

(1) Ziehl, Zur Färbung der Tuberkelbacillus (*Deustche med. Wochenschr.*, 1882 et 1883).

(2) Nicolle, Pratique des colorations microbiennes (*Ann. de l'Inst. Pasteur*, IX, 1895, p. 664).

(3) Ce bleu est fourni en solution par la maison Grübler.

Fuchsine de Lubimoff.

Fuchsine rubine	$0^{gr},5$
Acide borique	$0^{gr},5$
Alcool absolu	15 centimètres cubes.
Eau distillée	20 —

Bleu de Sahli.

Solution aqueuse de borax à 5 p. 100	16 centimètres cubes.
Solution aqueuse de bleu de méthylène	24 —
Eau distillée	40 —

Le *Bleu composé de Roux* donne de très bons résultats également, surtout avec le *Bacille de la diphtérie*; il s'obtient par le mélange de deux solutions, une de violet, l'autre de vert d'aniline.

On mélange un tiers de la solution A et deux tiers de la solution B.

Bleu de Roux.

Solution A :	Violet dahlia	1 gramme.
	Alcool à 90°	10 grammes.
	Eau distillée	90 —
Solution B :	Vert de méthyle	1 gramme.
	Alcool à 90°	10 grammes.
	Eau distillée	100 —

La teinte à donner au bain colorant, lorsqu'on le prépare directement avec les solutions alcooliques concentrées, s'acquiert très vite après un peu de pratique; quelques gouttes d'une solution alcoolique saturée ou très concentrée suffisent à colorer convenablement de 10 à 15 centimètres cubes de liquide. Le temps que doit durer l'immersion dans ce bain varie avec la nature des préparations, sans qu'il soit possible à cet égard de donner des règles générales. Tandis que quelques minutes peuvent suffire, il faut d'autres fois un temps beaucoup plus long pour obtenir une bonne coloration. Il est heureusement facile de suivre les progrès du réactif en retirant de temps en temps la préparation; on s'aperçoit facilement, même à l'œil nu, de l'intensité de la teinte prise. Enfin, une surcoloration n'est souvent pas sans remède; on la réduit facilement en faisant agir les *agents décolorants*.

Les mains tachées par l'usage de ces bains de couleurs d'aniline sont décolorées facilement par l'alcool, l'alcoolé de savon, les acides étendus.

5° EMPLOI DES AGENTS DÉCOLORANTS

Lorsqu'on traite des objets colorés, par certains réactifs très avides de couleur, ils leur abandonnent une proportion de la matière qui les teint et se décolorent d'autant; il peut même arriver, si la couleur n'est pas fortement retenue et le réactif bien approprié, que la décoloration soit complète. Dans d'autres cas, il y a plus: le réactif peut modifier ou détruire la substance colorante; et il le fait toujours d'autant mieux et plus vite que la combinaison de celle-ci avec l'élément qu'elle imprègne est moins forte. C'est une relation en tout analogue aux lois de Berthollet. Pour les Bactéries, il semble y avoir un rapport direct entre la facilité de la coloration et celle de la décoloration; des cellules, qui se

colorent très rapidement dans les bains ordinaires, perdent tout aussi vite leurs nuances traitées par des agents décolorants, et, inversement, lorsque l'action du bain a dû être prolongée, la coloration obtenue résiste beaucoup plus. On ne connaît pas encore les causes de ces particularités; on pense que la résistance à la décoloration, si remarquable chez certaines espèces, est due à la présence dans la membrane ou le protoplasma de substances particulières formant avec les couleurs des composés très stables. Ce serait une matière grasse ou cireuse, des acides gras, pour certaines espèces (1), du tannin (2) ou des corps voisins pour d'autres.

Les *agents décolorants* les plus usités sont, par ordre d'importance, l'alcool, les acides, les alcalis et certains réactifs neutres.

1° *Décoloration par l'alcool.*

L'*alcool* est certainement celui qui servira le plus. On emploie l'alcool à 95° ou, mieux, l'alcool absolu. La rapidité de la décoloration est très variable; parfois la lamelle doit être simplement plongée dans l'alcool, puis retirée immédiatement et lavée à grande eau pour arrêter de suite l'action du réactif, ou bien elle doit y séjourner pendant un temps assez long, parfois un jour et plus, pour que l'effet voulu soit produit. Lorsque la décoloration est rapide, il est préférable d'user d'alcool dilué, pour pouvoir mieux graduer l'emploi du réactif.

On peut renforcer la puissance décolorante de l'alcool en lui ajoutant 2 p. 100 de fluorescéine jaune acide (Kühne) ou 0,25 p. 100 de vert lumière (*Lichtgrün FS*) (Benda).

Méthode de Gram. — L'alcool, après action de l'iode, a été préconisé par Gram (3); cette technique est très connue sous le nom de *Méthode de Gram*. L'iode sert de mordant, de fixatif ou de modificateur pour le colorant en formant avec lui un composé qui jouit d'une élection pour certaines Bactéries et pas pour d'autres; la décoloration vraie est produite par l'action ultérieure de l'alcool. Voici la formule qu'il indique pour user de ce réactif :

Solution de Gram (ou encore : *Solution de Lugol*).

Iode	1 gramme.
Iodure de potassium	2 grammes.
Eau distillée	300 —

Les préparations, sorties du bain colorant, au mieux d'un bain au violet de gentiane ou à la thionine, additionné ou non d'eau phéniquée, sont, après lavage à l'eau, plongées dans cette solution jusqu'à ce qu'elles prennent une teinte noirâtre, ce qui demande une à deux minutes. Elles sont lavées à l'alcool à 95° ou, mieux, absolu, jusqu'à ce que la teinte noire *devienne gris pâle*, ce qui s'obtient en quelques

(1) Bienstock, Zur Frage der sog. Syphilisbacillen und der Tuberkelbacillen-Färbung (*Fortschr. der Med.*, 1886, n° 6). — Gottstein, Die Beeinflussung des Färbungsverhaltens von Microorganismen durch Fette (*Ibid.*, n° 8). Voy. aussi p. 44.

(2) Spina, Recherches sur la décoloration des Bactéries (*Allgem. Wiener med. Zeit.*, 1887).

(3) Gram, Ueber die isolirte Färbung der Schizomyceten in Schnitt und Trockenpraeparaten (*Fortschr. der Med.*, II, 1884, p. 185).

minutes ou lentement. C'est le point un peu délicat de la méthode ; souvent, pour bien réussir, il faut quelques tâtonnements. Le même bain d'alcool peut servir assez longtemps, jusqu'à ce qu'il ait pris une coloration bien marquée.

Ce procédé expose moins que le précédent à une forte décoloration ; de plus, il fournit des caractères de détermination précieux : certaines espèces, se décolorant bien par son emploi, se distinguent par là d'autres qui, traitées de la même façon, gardent la couleur. Dans une préparation où se trouvent des cellules, coupe d'organe ou lamelle préparée à sec avec du sang ou du pus, les éléments ne gardent qu'une légère coloration jaunâtre, tandis que les Bactéries sont fortement colorées en violet noir lorsqu'on a usé d'un bain au violet ; il est du reste possible, comme nous le verrons, d'user ensuite d'une double coloration.

Ces particularités de coloration seraient dues aux acides gras qui se trouvent dans les corps microbiens. Ces acides gras se colorent au violet d'aniline à l'encontre des graisses neutres qui restent incolores ; après l'action de l'iode, les acides gras non saturés gardent la couleur, tandis que les acides saturés supérieurs ne la gardent pas et la cèdent au lavage à l'alcool (1).

Méthode de Gram modifiée par Nicolle. — Nicolle (2) a modifié avantageusement la méthode de Gram ainsi qu'il suit. Les lamelles, fixées par le mélange d'alcool et d'éther, sont colorées à la *solution de thionine phéniquée* (p. 377). Au sortir du bain colorant, *sans être lavées*, elles sont soumises à l'action d'une solution de Gram forte :

Solution de Gram forte.

Iode	1 gramme.
Iodure de potassium	2 grammes.
Eau distillée	200 —

On les laisse dans la solution de quatre à six secondes, mais en la renouvelant une ou deux fois. On décolore par l'*alcool-acétone* (alcool absolu additionné d'un tiers d'acétone), qui décolore plus vite et plus sûrement que l'alcool absolu.

Il est possible alors de pratiquer une double coloration, avec l'éosine par exemple ; certaines Bactéries restent colorées en violet ; d'autres, ou des éléments cellulaires divers, ont pris la teinte rose.

Cette *méthode de Gram*, simple ou modifiée, a une importance considérable en Bactériologie. C'est un élément de *diagnostic* important ; les Bactéries qui *prennent le Gram* sont ainsi facilement différenciées d'autres qui *ne le prennent pas* et qui peuvent leur ressembler beaucoup comme formes, comme caractères de cultures et même comme réactions à l'égard des colorants ordinaires. Voici la liste des principales espèces dont il est important de connaître la façon de réagir lorsqu'on leur applique cette méthode :

(1) Guerbet, Mayer et Schaeffer, Sur les réactions microchimiques des corps gras et la réaction de Gram (*C. R. Soc. de Biol.*, LXVIII, 1910, p. 353).

(2) Nicolle, Pratique des colorations microbiennes (*Ann. de l'Inst. Pasteur*, IX. 1895, p. 664).

Espèces qui restent colorées par la méthode de Gram.

Bacillus aerophilus.
— *alvei.*
— *amylobacter.*
— *anthracis*
— *anthracoides* (Hueppe et Wood).
— *botulinus.*
— *butyricus.*
— *caniperda* (Galli-Valerio).
— *carotarum.*
— *caucasicus.*
— *Chauvæi* (il faut colorer fortement).
— *chlororaphis* (difficilement).
— *coprogenes fœtidus.*
— *diphteriæ* (garde assez mal la couleur).
— *Ellenbachensis.*
— *enteridis sporogenes.*
— *endocarditis griseus.*
— *filiformis* (Tils).
— *fuscus.*
— *heminecrobiophilus.*
— *lacticus.*
— *lactis erythrosporus.*
— *lactis niger.*
— *lepræ.*
— *liodermos.*
— *megaterium.*
— *mesentericus fuscus.*
— *mesentericus niger.*
— *mesentericus ruber.*
— *mesentericus vulgatus.*
— *muripestifer* (Laser).
— *murisepticus.*
— *mycoides.*
— *mycoides roseus.*
— *oxalaticus.*
— *perfringens.*
Bacille du phlegmon gazeux (Fraenkel).
Bacillus polychromogenes.
— *pseudobutyricus* (Hueppe).
— *pseudodiphtericus* (Hoffmann).
Bacilles pseudo-tuberculeux (Moeller et Rabinowitch).
Bacille de la pseudo-tuberculose du veau (Vallée).
Bacille de la pseudo-tuberculose du mouton (Preisz).
Bacillus putrificus coli.
Bacille du rhinosclérome.
— *du rouget du porc.*
— *de la séborrhée grasse* (Sabouraud).
— *septique aérobie* (Legros).
— *septique de la vessie* (Clado).
— *du smegma.*
Bacillus solaniperda.
— *subtilis.*
— *syncyanus.*
Bacillus tetani.
— *tuberculosis.*
— *tumescens.*
— *viscosus lactis.*
— *xerosis.*
— *Zopfii.*
Cladothrix actinomyces (filaments et quelquefois les masses très jeunes).
Cladothrix asteroides.
— *capræ.*
— *chromogenes.*
— *farcinica* (l'action prolongée de l'alcool décolore).
— *Fœrsteri.*
— *Maduræ.*
— *mordoré.*
— *violacea.*
Clostridium fœtidum.
— *polymyra.*
Leptothrix buccalis.
Micrococcus acidi lactici (Marpmann).
— *agilis.*
— *albicans amplus.*
— *albicans tardissimus.*
— *aquatilis.*
— *ascoformans.*
— *aurantiacus.*
— *Brison.*
— *candicans.*
— *candidus.*
— *carneus.*
— *cereus albus.*
— *cereus flavus.*
— *cinnabareus.*
Micrococque du clou de Biskra.
Micrococcus concentricus.
— *corallinus.*
— *coralloides.*
— *coronatus.*
— *citreus.*
— *citreus conglomeratus.*
— *cremoides.*
— *enteritis* (Entérocoque).
— *fervitosus.*
— *flavus desidens.*
— *flavus liquefaciens.*
— *flavus tardigradus.*
Micrococque de la gourme du cheval.
Micrococcus hæmatodes.
— *lacteus faviformis.*
— *luteus.*
Micrococque de la mammite de la brebis (décoloration partielle).
Micrococque de la mammite de la vache.
Micrococcus ochroleucus.
— *Pasteuri.*
— *pyogenes* (1).
— *pyogenes albus.*

(1) Nous verrons plus loin, en étudiant le *Streptocoque pyogène*, qu'Étienne (*Arch. de méd. expér.*, 1895) et Lemoine (*Soc. de Biol.*, 21 décembre 1895) ont signalé des

Micrococcus pyogenes aureus.
— *pyogenes citreus.*
— *radiatus.*
— *rosettaceus.*
— *roseus.*
— *subflavus.*
— *sulphureus.*
— *tetragenus.*
— *ureæ.*
— *ureæ liquefaciens.*
— *versicolor.*
— *violaceus.*
— *viticulosus.*
Pediococcus cerevisiæ.
Proteus mirabilis.
— *vulgaris.*
— *Zenkeri.*
Pseudo-méningocoque de Jæger (Diplococcus crassus).
Sarcina alba.
— *aurantiaca.*
Sarcina candida.
— *flava.*
— *incana.*
— *Lœwenbergi.*
— *lutea.*
— *mobilis.*
— *pulmonum.*
— *rosea.*
— *ventriculi.*
Spirillum rubrum.
— *rugula.*
Tyrothrix distortus.
— *geniculatus.*
— *scaber.*
— *turgidus.*
— *urocephalum.*
Urobacillus Duclauxi.
— *Freudenreichi.*
— *Maddoxi.*
— *Pasteuri.*
— *Schützenbergi.*

Espèces se décolorant par la méthode de Gram.

Bacillus aceticus (Kützing).
— *acidi lactici* (Hueppe).
— *aquatilis sulcatus.*
— *arborescens* (Frankland).
Bacille du barbone des buffles.
Bacillus brunneus.
Bacille butyrique de Botkin.
Bacillus cavicida.
Bacille du chancre mou.
Bacillus choleræ gallinarum.
— *cloacæ* (Jordan).
— *cæruleus* (Voges).
— *coli communis.*
Bacille de la conjonctivite aiguë (Weeks).
— *de la conjonctivite chronique* (Diplobacille).
— *des crachats verts* (Frisch).
Bacillus crassus sputigenus.
Bacille de la diarrhée des veaux (Jensen).
— *de la diarrhée verte.*
— *de la diphtérie aviaire.*
— *de la diphtérie des pigeons.*
— *de la diphtérie du lapin.*
Bacillus dysenteriæ.
— *enteritidis.*
— *fluorescens aureus.*
— *fluorescens liquefaciens* (reste parfois un peu coloré).
Bacille fluorescent pathogène (Lepierre).
Bacillus fluorescens putridus.
— *fæcalis alcaligenes.*
— *Friedländeri.*
Bacille fusiforme (Vincent).
Bacillus hydrophilus fuscus.
Bacille ictéroïde (Sanarelli).
Bacillus influenzæ.
— *indigoferus.*
— *indigouaceus.*
— *janthinus.*
— *lactis aerogenes.*
— *luteus.*
Bacille de la maladie des chiens (Lignières).
Bacillus mallei.
— *miniaceus.*
— *murisepticus pleomorphus.*
— *ochraceus.*
— *oxytocus perniciosus.*
Bacille de l'ozène.
Bacillus Pasteurianus.
Bacille de la peste des écrevisses.
— *de la peste des truites.*
Bacillus pestis.
— *pneumonicus agilis.*
Bacille de la pneumonie contagieuse du cobaye.
Bacille de la pourriture d'hôpital.
Bacillus prodigiosus.
Bacille de la pseudo-tuberculose (Du Cazal et Vaillard).
Bacille de la pseudo-tuberculose des rongeurs.
Bacille de la pseudo-tuberculose zoogléique.
Bacillus pyocyaneus.
— *ranicida.*
Bacille rouge de l'eau (Lustig; incomplètement).
Bacille rouge de Kiel.

Streptocoques se *décolorant* par la méthode de Gram. Le dernier auteur cité a vu, dans des cultures différentes, le même microbe présenter la réaction habituelle et se décolorer par le Gram.

Bacille rouge de la sardine (Dubois Saint-Sévrin).
Bacillus ruber (Zimmermann).
— *saccharobutyricus.*
Bacille de la septicémie des canaris.
— *de la septicémie du faisan.*
— *de la septicémie des furets.*
— *de la septicémie de la grenouille.*
— *de la septicémie hémorragique du cheval.*
— *de la septicémie hémorragique des bovidés.*
— *de la septicémie du lapin.*
— *de la septicémie des veaux* (Thomassen).
Bacillus septicus (peut rester coloré après l'action prolongée du colorant).
Bacillus septicus putridus (Roger).
— *suipestifer.*
— *suisepticus.*
— *synxanthus.*
Bacillus tracheiphilus (Smith).
— *turçosa* (Zimmermann).
— *typhi murium.*
— *typhosus.*
— *ureæ.*
— *violaceus.*
Cladothrix actinomyces (massues).
Micrococcus catarrhalis.
— *gonorrheæ.*
Micrococcus intracellularis meningitidis.
— *melitensis.*
— *orchitis.*
Microcoque de la mammite de la chèvre.
Microcoque des oreillons (Laveran et Catrin).
Sarcina pseudogonorrheæ (Nagano).
Spirillum berolinense.
— *choleræ.*
Spirille d'Iwanoff.
— *nasal* (Weibel).
Spirillum tonsillare.

Il y a certainement des espèces pour ainsi dire indifférentes à l'égard de la méthode de Gram, qui restent colorées dans certaines conditions et se décolorent dans d'autres. C'est ce qui peut expliquer en partie les divergences que l'on remarque dans l'opinion de bien des auteurs.

Les Bactéries qui se *décolorent par la méthode de Gram*, peu aptes à conserver les couleurs d'une façon générale, demandent, pour être toujours bien colorées, l'application de procédés spéciaux basés sur l'emploi de produits jouant le rôle de mordants, favorisant la fixation du colorant.

On peut se servir, dans ce but, de plusieurs des solutions indiquées précédemment (p. 375), surtout de celles à base d'eau anilinée, d'acide phénique, de borax. Certaines méthodes donnent, dans ce cas particulier, de meilleurs résultats.

Nicolle (1) conseille de colorer les lamelles ou les coupes dans le bleu de Lœffler ou de Kühne, de laver et de les traiter par une solution aqueuse de tannin à 1 p. 10 dont l'action est instantanée. On lave à l'eau, puis on peut déshydrater à l'alcool absolu, éclaircir à l'essence de girofles, passer au xylol et monter dans le baume au xylol.

Garnier (2) dit qu'il est préférable, avant de colorer en bleu, de traiter par la solution de Gram forte (p. 380), laver et colorer au bleu de Kühne, puis faire agir pendant une ou deux minutes le molybdate d'ammoniaque en solution suivant la formule ci-dessous :

Molybdate d'ammoniaque cristallisé	1 gramme.
Eau distillée	10 grammes.

Laver minutieusement à l'eau distillée, surtout pour les coupes, passer à l'alcool absolu, à l'essence de girofles, au xylol, et monter dans le baume. On peut, auparavant, faire une double coloration convenable pour le fond.

(1) Nicolle, Méthode de recherche des microorganismes qui ne se colorent pas par le procédé de Gram (*Ann. de l'Inst. Pasteur*, VI, 1892, p. 783).
(2) Garnier, Nouveau procédé de coloration pour les Bactéries qui ne prennent pas le Gram (*Presse méd.*, 26 janvier 1901).

2° *Décoloration par les acides.*

Les *acides minéraux* sont des décolorants trop énergiques qui doivent être réservés pour quelques cas spéciaux. De rares espèces, les *Bacilles de la tuberculose*, *de la lèpre*, *du smegma préputial*, des Bacilles divers dits *pseudo-tuberculeux*, par exemple, résistent seuls à leur action (*Saurefeste*) et gardent leur couleur. D'où l'importance de cette méthode de décoloration dans la recherche de ces espèces.

Ehrlich (1) a annoncé, le premier, que le *Bacille de la tuberculose* résistait à l'action de l'acide azotique au tiers (acide azotique ordinaire, une partie ; eau, deux parties). L'usage de ce décolorant est devenu dès lors d'une pratique courante dans la recherche de cette espèce. L'action doit toutefois être suivie de très près, car la résistance n'est que relative ; si le contact est trop prolongé, toute coloration, même la plus intense, ne tarde pas à disparaître. L'acide azotique forme, avec les couleurs d'aniline, des composés incolores ; c'est la raison de la décoloration qu'il provoque. Avant d'en arriver à ce dernier terme, il se produit des nuances verdâtres, puis jaunes. Il faut arrêter l'effet à l'apparition du vert, ou tout au moins dès les premières nuances jaunes, par un lavage immédiat. Sous l'influence de l'eau, une faible partie du colorant se régénère, la préparation reparaît très légèrement teintée de la nuance primitive. On peut, du reste, faire agir le réactif à plusieurs reprises, jusqu'à ce que le résultat soit obtenu.

Au lieu d'acide nitrique, on a employé l'acide sulfurique, l'acide chlorhydrique dilués, l'acide sulfureux.

Hauser (2) préfère, comme décolorants, à l'acide nitrique, surtout pour la recherche du *Bacille de la tuberculose*, les *acides organiques*, acétique, tartrique, picrique, et, principalement, lactique. Dans les solutions de 5 à 10 p. 100 d'eau, la décoloration se fait bien ; le *Bacille de la tuberculose* résiste pendant longtemps, une demi-heure au moins.

3° *Décoloration par d'autres réactifs.*

Koch a employé comme décolorant une solution de *carbonate de potasse*, obtenue en mélangeant une solution saturée de ce sel avec un même volume d'eau distillée. Malassez et Vignal (3) se sont servis de carbonate de soude ainsi préparé :

Solution aqueuse de carbonate de soude à 2 p. 100......	2 volumes.
Alcool absolu..	1 volume.

Le *sublimé corrosif* a donné à Gram de bons résultats, qu'il faut se garder de confondre avec ceux obtenus à l'aide de sa solution iodée, dont l'emploi doit seul être désigné sous le nom de *méthode de Gram*.

(1) Ehrlich, *Zeitschr. für klin. Med.*, II, p. 307, et *Berlin. klin. Wochenschr.*, 6 mai 1882.

(2) Hauser, Note sur la coloration du Bacille de la tuberculose (*Soc. de Biol.*, 29 octobre 1898).

(3) Malassez et Vignal, Sur le microorganisme de la tuberculose zoogléique (*Arch. de physiol.*, IV, 1884).

Les préparations, surtout les coupes, bien lavées à l'eau distillée après coloration, sont placées dans une solution de sublimé à 1 p. 100. On les y laisse séjourner quelque temps et on les lave à l'eau distillée d'abord, puis avec un peu d'alcool absolu. Le sublimé joue plutôt un rôle de fixateur ; c'est l'alcool qui est le décolorant actif.

La *glycérine*, les *essences de girofle* et *de bergamote* décolorent peu à peu les Bactéries, mais leur action est trop lente et trop inégale pour l'utiliser d'une façon courante. Il faut y songer cependant quand on a à traiter des préparations par ces réactifs, comme éclaircissants ou conservateurs.

Le chlorhydrate d'aniline, en solution aqueuse à 2 p. 100, est un bon agent décolorant, mais d'emploi un peu coûteux parce qu'il ne faut employer que des solutions fraîches.

Méthode de Claudius. — Claudius (1), après fixation à l'acide picrique, emploie comme décolorant le chloroforme ou l'essence de girofles.

La lamelle, séchée et flambée, est colorée dans une solution aqueuse de violet de méthyle (violet de méthyle 5B extra, Merck) à 1 p. 100, pendant une minute, puis lavée à l'eau ; elle est ensuite soumise pendant une minute à l'action d'une solution d'acide picrique dans l'eau distillée, formée de 1 volume d'une solution saturée, plus 1 volume d'eau, lavée et étanchée au papier-filtre ; on lave au chloroforme tant qu'il y a décoloration (l'opération se fait économiquement dans une petite fiole à large goulot, bouchée à l'émeri). Il est possible de remplacer le chloroforme par l'application successive de quelques gouttes d'essence de girofles, jusqu'à décoloration complète.

Voici, d'après Claudius, une liste d'espèces qui *restent colorées* par cette méthode :

Staphylocoque doré.
— *blanc.*
Pneumocoque.
Bacille de la diphtérie.
— *du charbon.*
— *du rouget du porc.*
Bactérie du farcin du bœuf.
Tétragène.
Bacille du tétanos.
Bacille de la lèpre.
— *de la tuberculose* (prend mal la couleur).
Bacillus megaterium.
Bacille de la septicémie de la souris.
— *du charbon symptomatique.*
Vibrion septique.
Bacillus nekroseos de Bank.

Par contre, les espèces suivantes *ne restent pas colorées* :

Bacille typhique.
Colibacille.
Spirille du choléra.
— *de Metschnikoff.*
Pneumobacille.
Gonocoque.
Bacille du lait bleu.
— *pyocyanique.*
Micrococcus prodigiosus.

Le même traitement peut être appliqué aux coupes, préalablement collées sur lamelles ; il est préférable d'employer comme décolorant l'essence de girofles, par gouttes successives enlevées avec du papier buvard. Ce procédé est compatible avec une coloration préalable des noyaux, par le carmin au lithium, par exemple.

(1) Claudius, Méthode de coloration à la fois simple et contrastante des microbes (*Ann. de l'Inst. Pasteur*, XI, 1897, p. 332).

Cette méthode de Claudius paraît donner des résultats plus constants que la véritable méthode de Gram. Le *Vibrion septique*, le *Bacille du charbon symptomatique*, le *Bacille diphtérique*, entre autres, qui prennent mal et irrégulièrement le Gram, donneraient toujours une réaction positive par la méthode de Claudius.

Méthode de Weigert. — Weigert (1) emploie l'*huile d'aniline* comme décolorant. Les préparations ou les coupes sont colorées à chaud dans un bain de violet, puis soumises pendant trois ou quatre minutes à l'action de la solution iodo-iodurée de Gram. Il traite par l'huile d'aniline jusqu'à transparence parfaite; l'huile extrait une grande partie du violet. La préparation est immergée dans le xylol, puis montée dans le baume.

Enfin, des solutions d'*autres couleurs d'aniline* peuvent déplacer une couleur qui n'est pas très fortement fixée et substituer leur coloration. On obtient alors des *colorations de contraste*; la couleur employée en dernier chasse la première coloration sur les éléments qui ne retiennent pas énergiquement leur première nuance. Ainsi, dans une préparation de crachats tuberculeux colorés à la fuchsine par la méthode d'Ehrlich à l'eau anilinée, puis plongée dans la solution bleue de Lœffler, le bleu de méthylène chasse la fuchsine qui imprègne les éléments et les Bactéries des crachats, sauf celles que fixent les *Bacilles tuberculeux* qui resteront colorés en rouge. Le bleu de méthylène cède de la même façon au brun de Bismarck. Mais, ce que l'on obtient le plus souvent de cette façon, ce sont des doubles colorations dont il va être question.

Qu'on se serve de l'un ou de l'autre de ces différents procédés de coloration, l'action du réactif ne se fait que progressivement : les éléments les moins avides de couleur la cèdent avant ceux qui la retiennent mieux. En arrêtant donc cette action à différents stades, on obtiendra des aspects divers, certains éléments colorés dans telle préparation seront incolores ou diversement nuancés dans d'autres. Lorsqu'on a affaire à des coupes d'organes où se trouvent des éléments variés, le phénomène suit une marche à peu près régulière. Ainsi, une coupe colorée d'une façon diffuse par une immersion dans le bain de violet de méthyle, traitée par l'alcool absolu, se décolorera graduellement de la façon suivante : la substance intercellulaire perd d'abord sa couleur, puis les fibres conjonctives, le protoplasma des cellules, les noyaux, et, en dernier lieu, les Bactéries.

6° DOUBLE COLORATION

Lorsqu'une préparation a subi l'action des réactifs décolorants, il est facile, en faisant agir d'autres substances colorantes, de teindre d'une nuance, différente de la première employée, les éléments qui ont perdu la couleur. On peut obtenir ainsi, dans cette *double coloration*, par un choix habile des couleurs, des contrastes très utiles pour l'observation

(1) Weigert, Zür Technik der bacteriologischen Untersuchungen (*Virchow's Arch.*, Bd LXXXIV).

de la préparation, et la distinction des diverses espèces de Bactéries qui s'y trouvent. De plus, quand il n'existe que de rares Bactéries ayant gardé la première couleur employée, la mise au point s'opère avec bien plus de facilité, chose qui n'est pas à dédaigner, on pourra s'en assurer.

Koch s'est servi le premier d'une méthode de *double coloration* pour distinguer les *Bacilles de la tuberculose* des autres espèces qui les accompagnent toujours dans les crachats. Il a mis à profit cette observation, qu'il avait faite, qu'en plongeant une lamelle préparée, fortement colorée au bleu de méthylène à l'aide d'une solution alcaline, dans un bain de vésuvine, cette dernière couleur se substituait en partie à la première, qui ne restait fixée que sur les Bactéries de la tuberculose.

Il est plus sûr de soumettre la préparation à un agent décolorant, en opérant comme on l'a vu précédemment. Après action complète du réactif, elle est lavée avec soin et mise dans le second bain, où elle ne doit rester que peu de temps. La seconde coloration, *coloration de fond*, gagne à être légère ; les éléments histologiques surtout doivent être simplement teintés ; aussi faut-il surveiller de près l'immersion, qui ne doit durer que fort peu de temps, quelques secondes souvent si le bain colorant est foncé.

Pour répondre au mieux au but proposé, les couleurs à employer doivent produire un contraste bien évident. Koch a employé le bleu et le brun ; ils peuvent encore être utiles pour des cas spéciaux, comme la photographie. On obtient de fort bonnes préparations en colorant d'abord à la fuchsine et en se servant de bleu de méthylène comme couleur de fond. On a souvent avantage à employer, comme *colorants diffus*, le *vert lumière* (*Lichtgrün FS*), le *violet acide* (*Saüreviolett*), la *fuchsine acide* (*Fuchsine S* ou *Saürerubin*), l'*orange G* et particulièrement l'*éosine*.

Il ne faut prendre que l'*éosine* soluble dans l'eau. C'est un colorant des plus énergique et très pénétrant, mais qui ne possède pas la moindre élection. Aussi fournit-elle de très beaux fonds rose rouge sur lesquels les bleus et les violets se détachent admirablement. Les mélanges de bleu de méthyle et d'éosine donnent souvent de belles doubles colorations faisant voir nettement les différences qui existent dans le contenu cellulaire (1).

La coloration de fond peut, du reste, varier suivant le désir de l'observateur ; elle s'obtient, pour les violets, avec l'éosine ou certains carmins à coloration rouge ; pour la fuchsine, avec l'hématoxyline ou le bleu de méthylène ; pour le bleu de méthylène, avec l'éosine, la safranine, qui donnent des teintes rosées.

En faisant agir sur une même préparation plusieurs couleurs, soit simultanément en employant une solution contenant un mélange de couleurs différentes, deux ou plus, soit successivement en la soumettant à l'action de deux ou plusieurs solutions de couleurs différentes employées l'une après l'autre, on peut obtenir de très appréciables résultats. Les corps microbiens, certaines de leurs inclusions, fixent parfois de préférence l'un des colorants employés, alors que l'autre teint le reste ; on peut obtenir de la sorte une coloration spécifique de la *chromatine* (Voy. p. 26).

(1) Zieмann, Eine methode der Doppelfärbung bei Flagellaten, Pilze und Bakterien, sowie einigen Amöben (*Centralbl. für Bakt.*, XXIV, 1898, p. 945). — Zetnow, Romanowski's Färbung bei Bakterien (*Zeitschr. für Hygiene*, XXX, 1899, p. 1).

Dans ce but, on emploie surtout les bleus d'aniline et l'éosine. Il se peut même qu'il y ait ici plus que mélange d'action des colorants, mais une certaine combinaison du bleu, bleu de méthylène ou bleu azur, couleur basique, avec l'éosine, couleur acide, agissant d'une façon qui lui est propre.

Le procédé de coloration de Romanowsky (1), qui réussit bien pour les Hématozoaires, donne également de très bons résultats pour les Bactéries.

Solution de Romanowsky.

Solution aqueuse saturée de bleu de méthylène médicinal de Höchst	2 volumes.
Solution d'éosine (A. G. de Höchst) à 1 p. 1000	5 —

Laisser la coloration se faire pendant plusieurs heures, puis laver à l'eau.

Les mélanges de bleu azur et d'éosine donnent des colorations bien préférables. Comme emploi, le *procédé de Giemsa* et le *procédé de Marino* sont tous deux très recommandables.

Procédé de Giemsa. — On prépare :

Solution de Giemsa (2).

Bleu azur II et éosine (mélangés en parties égales)	3 grammes.
Bleu azur II	$0^{gr},8$

L'azur II est un mélange d'azur de méthylène et de bleu de méthylène à parties égales.

Bien dessécher dans le dessiccateur à acide sulfurique, pulvériser finement, passer au tamis de soie ; mélanger par agitation à 250 grammes de glycérine chauffée à 60°. Ajouter ensuite 250 grammes d'alcool méthylique chauffé à 60°; bien agiter; laisser vingt-quatre heures à la température de la chambre et filtrer. Cette solution se trouve toute prête chez Grübler.

La préparation est fixée à l'alcool absolu ou à l'alcool méthylique (deux à trois minutes). L'excès d'alcool est enlevé avec du buvard. Elle est mise dans un bain colorant formé d'une goutte de la solution précédente par centimètre cube d'eau distillée. La durée du séjour est de quinze à trente minutes. Laver sous un fort jet d'eau. Si la coloration est trop intense, elle peut se réduire par un séjour de quelques minutes dans l'eau distillée. La coloration est favorisée par un chauffage à 30°-40°. D'après Lœffler (3), on peut obtenir d'excellentes colorations rapides en faisant agir d'abord comme mordant une solution d'arséniate de soude à 5 p. 100, puis soumettant pendant une à cinq minutes au bain de bleu azur chauffé jusqu'à l'ébullition.

(1) ROMANOWSKY, Zur Frage der Parasitologie und Therapie der Malaria (*Petersb. med. Wochenschr.*, 1891).

(2) GIEMSA, Ein Vereinfachung und Vervollkomnung meiner Methylenazur-Methylenblau-Eosin-Farbemethode zur Erzielung der Romanowsky-Nochtschen Chromatinfärbung (*Centralbl. für Bakt.*, 2te Abth., Orig., XXXVIII, 1904, p. 308).

(3) LŒFFLER, Neue Verfähren zur Schnellfärbung von Mikroorganismen, in besondere der Blutparasiten, Spirochaeten, Gonococcus und Diphteriebacillen (*Deutsche med. Wochenschr.*, 31 janv. 1907, p. 169).

Procédé de Marino (1). — On fait agir la solution suivante :

Solution de Marino.

Bleu azur.................................	0gr,10
Alcool méthylique........................	50 centimètres cubes.

Il est inutile de fixer, l'alcool méthylique le faisant.

On verse sur la lame environ un centimètre cube de la solution ; on laisse agir pendant une dizaine de minutes et, sans laver ou même enlever l'excès de bleu, on laisse tomber environ un centimètre cube de solution aqueuse d'éosine à 2 p. 100, on laisse agir deux minutes, puis on lave à l'eau.

On obtient de très belles colorations pour les Spirilles et en particulier celui de la syphilis.

Pour les Bactéries autres, la manipulation peut être simplifiée : Fixer par trois passages à la flamme ; colorer pendant une demi-minute dans une solution aqueuse de bleu azur à 1 p. 500, puis passer dans le bain d'éosine.

D'autres détails sur ces colorations spéciales seront donnés à l'étude des espèces pour lesquelles on les emploie surtout.

7° RECHERCHE DES BACTÉRIES DANS LES TISSUS

La recherche des Bactéries dans les tissus nécessite l'obtention de coupes très fines qui doivent être soumises aux différents procédés de coloration exposés ci-dessus pour la coloration des lamelles chargées de Bactéries, procédés qui peuvent être modifiés dans divers sens à cause de la présence d'éléments que l'on a souvent à faire valoir. Ces coupes ne peuvent guère être obtenues que par l'emploi des microtomes perfectionnés en usage pour l'histologie.

Pour l'obtention de coupes sériées ou de coupes très fines, il est nécessaire d'inclure à la paraffine ; il faut inclure de même si l'on désire amasser, pour une étude ultérieure, un grand nombre de matériaux que pourrait altérer un séjour prolongé dans les liquides conservateurs.

Les inclusions au *collodion* ou à la *celloïdine* peuvent aussi rendre des services ; cependant il faut reconnaître qu'en Bactériologie la *méthode des coupes par congélation*, si vantée par Kühne (2), est bien souvent la plus utile.

Les tissus doivent être fixés *aussi frais que possible* selon une des méthodes exposées page 369, puis durcis dans les alcools et coupés avec ou sans inclusions. On ne doit généralement fixer que de petits morceaux de tissus.

Pour colorer les éléments des tissus, on s'adressera de préférence aux colorants histologiques habituels, surtout à l'*hématoxyline* et aux préparations de *carmin*, lorsqu'une élection sera à rechercher. Parmi les

(1) MARINO, Coloration des Protozoaires (*Ann. de l'Inst. Pasteur*, XVIII, 1904, p. 761).

(2) KÜHNE, Recherche des Bactéries dans les tissus animaux. Paris, Carré, 1889.

solutions hématoxyliques, celle de Delafield est à recommander.

Hématoxyline de Delafield.

A 400 grammes d'une solution saturée d'ammoniaque dans l'eau, on ajoute 4 grammes d'hématoxyline cristallisée dissoute dans 25 centimètres cubes d'alcool à 95°. On laisse le tout exposé à l'air et à la lumière pendant trois ou quatre jours, on filtre et l'on ajoute 100 centimètres cubes de glycérine et 100 centimètres cubes d'alcool méthylique. On laisse au repos et, lorsque la solution est devenue très foncée, on filtre et conserve dans des flacons bien bouchés.

C'est un colorant très puissant qui doit être étendu d'une grande quantité d'eau. Il colore les tissus en violet noir ou bleuâtre et est un excellent colorant de fond avec la fuchsine.

Les différentes solutions de carmin, dont on trouvera la préparation en grands détails dans les ouvrages de technique microscopique (1), donnent d'excellentes colorations de coupes combinées avec le bleu de méthylène ; la formule suivante est très recommandable :

Carmin de Orth (carmin lithiné).

Solution aqueuse saturée à froid de carbonate de lithine......	Q. S.
Carmin pulvérisé	2gr,50

On ajoute avantageusement un dixième d'alcool à 95° (carmin de Orth alcoolisé).

Méthode de Gram appliquée aux coupes. — On porte les coupes, à l'aide d'une stapule, dans la solution d'iode, après les avoir colorées en violet foncé dans un bain de violet de gentiane ou de thionine. On décolore *à fond* par l'alcool absolu. Pour obtenir une coloration de fond, on emploie alors un bain aqueux faible d'éosine, de brun de Bismarck, d'hématoxyline, de carmin ou picrocarmin.

Méthode de Nicolle-Gram. — Nicolle recommande un procédé de triple coloration obtenue de la façon suivante : la coupe est débarrassée de la paraffine à l'aide du xylol, puis mise dans l'alcool absolu pour enlever le xylol. Elle est laissée un quart d'heure dans le carmin de Orth alcoolisé. Laver à l'eau. Faire agir la solution de violet phéniqué de quatre à six secondes en la renouvelant une ou deux fois. Décolorer par l'alcool-acétone au tiers. Passer rapidement dans l'*alcool picrique* (alcool à 95° additionné d'une trace d'acide picrique, de façon à obtenir une coloration jaune verdâtre très pâle). Déshydrater par l'alcool absolu ; xylol et baume de Canada.

Méthode de Kühne-Gram (2). — Les coupes se trouvant dans l'alcool, sont portées dans un bain de bleu, obtenu en ajoutant une certaine quantité de solution alcoolique concentrée à de l'eau phéniquée à 5 p. 100 ou à une solution de carbonate d'ammoniaque à 1 p. 100. La coloration demande un temps variable ; elle est généralement bonne

(1) Voy. surtout Bolles Lee et Henneguy, Traité des méthodes techniques de l'anatomie microscopique, 2e édit. Paris, Doin, 1896.

(2) Kühne, Recherche des Bactéries dans les tissus des animaux, traduit par Hermann, Paris, Carré, 1889.

après une demi-heure ; les espèces très résistantes, le *Bacille de la lèpre* entre autres, demandent jusqu'à deux heures.

Chaque coupe, rincée à l'eau, est plongée dans un bain acide obtenu en ajoutant 10 gouttes d'acide chlorhydrique à 50 grammes d'eau, jusqu'à ce que la couleur soit devenue bleu tendre, puis passée dans une solution aqueuse faible de carbonate de lithine (eau, 10 centimètres cubes ; solution aqueuse concentrée de carbonate de lithine, 6 à 8 gouttes) et portée dans de l'eau pure.

Il est nécessaire de pousser la décoloration par le bain acide jusqu'à ce que la teinte devienne bleu tendre, pour que les noyaux soient suffisamment décolorés et ne masquent pas les Bactéries. Le temps de séjour dans le bain varie naturellement suivant la préparation ; il faut opérer avec quelques tâtonnements.

La coupe, sortant de l'eau, est plongée dans un bain d'alcool absolu contenant un peu de bleu pour le teinter, puis portée dans de l'huile d'aniline colorée légèrement aussi avec du bleu. Cette addition d'un peu de bleu à l'alcool et à l'huile d'aniline est faite pour éviter le plus possible une nouvelle décoloration de la coupe par ces réactifs.

La préparation, ainsi déshydratée, est laissée quelques minutes dans une huile essentielle bien fluide, puis immergée dans un ou deux bains successifs de xylol et montée dans le baume après évaporation de la majeure partie du xylol qui l'imbibait.

On colore par cette méthode des Bactéries très difficiles à colorer par les procédés ordinaires.

Les préparations ainsi obtenues laissent bien souvent distinguer encore la structure des tissus. Il est cependant préférable de procéder à une double coloration. On transporte les coupes du xylol dans un bain d'huile d'aniline qui a dissous un peu de safranine. Les coupes, rincées dans l'huile d'aniline pure, doivent garder une teinte rosée. Elles sont alors passées par l'essence et le xylol.

Kühne conseille d'appliquer comme il suit la méthode de Gram à l'étude des Bactéries dans les tissus :

Les coupes sont colorées dans un bain assez foncé de violet, auquel on ajoute volume égal d'une solution aqueuse de carbonate d'ammoniaque à 1 p. 100. Après lavage à l'eau, on les immerge pendant quelques minutes dans une solution iodo-iodurée renfermant 2 d'iode et 4 d'iodure de potassium pour 100 d'eau. Après lavage à l'eau, la matière colorante est extraite par un bain d'alcool absolu coloré à la fluorescéine (2 p. 100). Cette dernière couleur est enlevée par l'alcool pur ; la préparation est passée dans l'huile d'aniline, dans une essence, dans le xylol, et montée enfin dans le baume.

Méthode de Weigert. — On procède comme il a été dit page 386 pour les lamelles.

Méthode de Nicolle pour les Bactéries qui ne prennent pas le Gram. — On procède comme il a été dit page 380 pour les lamelles. La modification indiquée par Garnier donne d'excellents résultats.

Méthode de Claudius. — Avec les quelques modifications indiquées page 385, elle donne de bons résultats pour les tissus.

Méthode de Giemsa (1). — Les coupes sont mises pendant dix minutes dans le liquide suivant :

Iodure de potassium	2 grammes.
Eau distillée	10 cent. cubes.
Solution de Lugol	3 —

lavées à l'eau distillée et traitées dix minutes par une solution d'hyposulfite de soude à 0,5 p. 100. On lave cinq minutes dans l'eau courante, passe à l'eau distillée, puis on colore de deux à douze heures dans la solution de Giemsa faite à 1 goutte pour 2 centimètres cubes d'eau en renouvelant le bain après la première demi-heure. On passe à l'eau distillée, puis on passe successivement dans les bains :

a) Acétone, 95 cent. cubes + Xylol 5 cent. cubes.
b) Acétone, 70 — + Xylol 30 —
c) Acétone, 30 — + Xylol 70 —
d) Xylol pur.

On monte à l'huile de cèdre ou au baume.

8° ÉTUDE DE QUELQUES MÉTHODES ET PROCÉDÉS SPÉCIAUX

1° *Préparation par impression.*

Sous le nom de *Klatschpreparate*, qu'on traduit par *préparation par impression*, Koch (2) a imaginé un procédé de préparation donnant des résultats très intéressants dans certains cas spéciaux. Une lamelle bien propre et flambée est appliquée sur la face supérieure d'une culture et serrée légèrement contre elle. Les éléments de la couche supérieure de la culture s'accolent au verre dans la position qu'ils occupaient. En soulevant doucement la lamelle, on peut réussir à leur faire conserver en partie leurs rapports. La préparation est soumise aux procédés ordinaires de fixation et de coloration. La méthode est très applicable aux colonies des cultures sur plaques et aux cultures en cristallisoirs. Elle

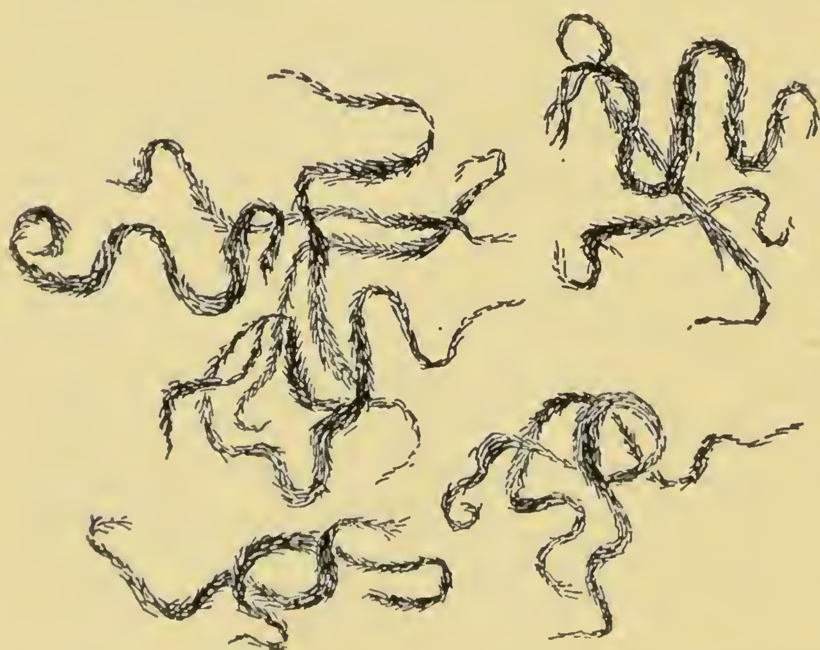


Fig. 185. — Préparation par impression de Bacille tuberculeux, obtenue d'un tubercule du rein de l'homme : 700/1 (d'après Koch).

(1) Giemsa, Ueber die Färbung von Schnitten mittels Azur-Eosine (*Deutsche med. Wochenschr.*, 1910, n° 12).
(2) Koch, Die Aetiologie der Tuberculose (*Mitth. aus dem kaiserl. Gesundheitsamte*, 1887, 1).

ne peut pas servir, par contre, pour les cultures en tubes. Elle est surtout avantageuse pour l'étude des espèces dont les colonies affectent des formes spéciales, caractéristiques. La figure 185 représente, d'après Koch, une préparation par impression d'une culture de *Bacille de la tuberculose*. La disposition et le groupement tout spécial des bâtonnets offrent un caractère d'autant plus important qu'on ne les retrouve pas seulement d'une façon constante dans les cultures artificielles, mais, dans le cas particulier, ils affectent les mêmes rapports dans l'organisme lui-même, lorsqu'ils peuvent végéter abondamment en un point.

On obtient également d'excellents résultats du procédé, en l'appliquant à l'étude d'espèces qui forment sur les milieux de culture des figures bizarrement contournées, dues à la disposition des éléments de la colonie.

2° *Coloration des spores.*

En traitant les cellules contenant des spores par certains réactifs, la chaleur par exemple, on parvient à colorer ces dernières qui résistent aux procédés de coloration ordinaire. Ces réactifs paraissent agir en diminuant la force de résistance de la membrane, qui se laisse alors imprégner par le colorant. Büchner (1) a obtenu la coloration des spores en les traitant au préalable par l'acide sulfurique concentré, ou par une forte solution de potasse caustique, ou en les soumettant pendant une demi-heure à une chaleur sèche de 120°. Aryesky (2) prend l'acide chlorhydrique dilué et bouillant, Orszag (3) un mélange de 4 parties de salicylate de soude à 0,5 p. 100 et 1 partie d'acide acétique à 5 p. 100. Hueppe (4) a donné un moyen infiniment plus pratique de les colorer : c'est de passer de six à dix fois la lamelle dans la flamme bleue du bec Bunsen au lieu de s'arrêter après la troisième, comme on le fait pour la fixation ordinaire ; cette méthode n'est naturellement pas applicable aux coupes.

Les lamelles ainsi passées dans la flamme sont portées dans un bain de fuchsine; on peut employer la solution aqueuse simple ou, mieux, la solution de fuchsine dans l'eau anilinée ou la solution de Ziehl. Elles doivent y rester longtemps, de une demi-heure à une heure. Les spores se montrent alors colorées en rouge intense, les bâtonnets en rouge plus clair.

Il est facile d'obtenir une *double coloration* très jolie. Les lamelles, colorées comme il vient d'être dit, sont traitées par l'alcool ou l'acide nitrique très étendu d'eau, ou l'acide sulfurique à 1 p. 100, jusqu'à décoloration presque complète, puis portées dans la solution de bleu de méthyle de Lœffler où on les laisse pendant deux minutes, et lavées à grande eau. Les spores se montrent colorées en rouge intense ; les bâtonnets sont teints en bleu pâle. Cette méthode de *double coloration des spores* est applicable aux coupes de tissus.

(1) Büchner, Ueber das Verhalten der Spaltpilzsporen zu den Anilinfarben (*Aertz. Intelligenzbl.*, 1885, p. 370).

(2) Aryesky, Eine Einfache Sporensfärbungsmethode (*Centralbl. für Bakt.*, XXIII, 1898, p. 329).

(3) Orszag, Ein einfache Verfahren zur Färbung der Sporen (*Centralbl. für Bakt.*, I, Orig., XLI, 1906, p. 397).

(4) Hueppe, Die Methoden der Bakterienforschung, 1887.

La *méthode de Moeller* (1) donne de très bons résultats. On procède de la façon suivante avec les lamelles préparées et simplement séchées :

1° Fixer deux minutes à l'alcool absolu, puis porter deux minutes dans du chloroforme. Ne pas laver ;

2° Faire agir pendant cinq minutes une solution d'acide chromique à 5 p. 100 ;

3° Colorer au Ziehl, cinq à six heures à froid, ou cinq à dix minutes à chaud ;

4° Décolorer au choix par :

a. L'alcool absolu (ne suffit pas toujours) :

b. L'acide sulfurique à 5 p. 100 (suivi d'alcool) ;

c. Le chlorhydrate d'aniline à 2 p. 100, quelques secondes (suivi d'alcool) ;

5° Laver et colorer au bleu.

Klein (2) emploie le Ziehl à chaud pendant six minutes, décolore à l'acide sulfurique, puis recolore au bleu.

3° *Coloration des cils.*

Les cils vibratiles des Bactéries mobiles prenant difficilement la couleur, ne se colorant jamais en particulier par les procédés de coloration simples, il est nécessaire, pour les étudier, de recourir à des méthodes spéciales. Nous allons décrire les meilleures des méthodes conseillées, en insistant cependant sur ce point qu'elles ne donnent trop souvent que des résultats imparfaits, bien qu'on s'attache à suivre à la lettre les prescriptions établies par leurs auteurs. Quelques détails ont déjà été donnés page 38 ; nous ne les répéterons pas ici où seront seulement exposées les méthodes les plus recommandables.

D'une façon générale, on doit se servir de préférence d'une jeune culture sur gélose du microbe que l'on veut étudier à ce point de vue. On en prélève une parcelle qui est délayée dans 2 ou 3 centimètres cubes d'eau distillée. Si l'on se sert d'une culture en bouillon, il faut la prendre très jeune, dès que le trouble apparaît. Zettnow tue la culture avec quelques gouttes de formol et la laisse déposer pendant un ou deux jours ; le dépôt est lavé avec de l'eau formolée à 1 p. 100, puis avec de l'eau distillée et enfin dilué dans une quantité suffisante d'eau distillée. Avec les dilutions ainsi obtenues, on prépare plusieurs lamelles. Pour obtenir de belles préparations, il faut que la dilution soit suffisante pour que les éléments se trouvent souvent isolés. Il faut éviter les chocs et les heurts qui cassent très facilement les cils si fragiles. Il faut éviter tout ce qui peut être autre que les éléments microbiens ; les mordants fixent la nuance sur tout, ce qui nuit à la netteté de la préparation. Les lamelles doivent être parfaitement propres, ainsi que les lames employées. Elles doivent être gardées dans un mélange d'alcool et d'éther. Le contact des doigts doit être évité, même pour l'eau de lavage ; de la matière sébacée pourrait être entraînée et adhérer à la

(1) Moeller, Ueber eine neue Methode der Sporenfärbung (*Centralbl. für Bakt.*, X, 1891, p. 273).

(2) Klein, Eine einfache Methode zur Sporenfärbung (*Centralbl. für Bakt.*, XXV, 1899, p. 376).

préparation. Les lamelles sèches sont passées trois fois dans la flamme pour fixation. Les préparations sont alors soumises à l'action des réactifs.

Il existe un très grand nombre de méthodes pour colorer les cils; celles qui donnent les meilleurs résultats seules seront citées.

1° *Méthode de Lœffler* (1). — Les préparations sont soumises à l'action d'un *bain mordant* composé ainsi qu'il suit :

Bain mordant.

Solution aqueuse de tannin à 20 grammes de tannin pour 80 grammes d'eau distillée.....	10 centimètres cubes.
Solution aqueuse de sulfate ferreux saturée à froid....................	5 — —
Solution saturée de fuchsine dans l'alcool absolu..................................	1 centimètre cube.

Ne pas filtrer le mélange; les solutions composantes ont dû être préalablement filtrées.

C'est un liquide qui ressemble beaucoup à de l'encre, d'où le nom d'*encre de fuchsine* qu'on lui donne souvent. Il est nécessaire de modifier la réaction de ce bain mordant suivant que l'on a affaire à un microbe qui développe de l'acide ou de l'alcali dans ses cultures. Pour les microbes acidifiants, il faut ajouter au bain quelques gouttes d'une solution de soude à 1 p. 100 (de 1 à 40 gouttes suivant le cas); c'est ce qu'on doit faire pour le *Bacille typhique* (20 gouttes), le *Colibacille* (20 gouttes), le *Vibrion septique* (36 à 38 gouttes), le *Bacille du charbon symptomatique* (34 gouttes), le *Bacillus subtilis* (28 à 30 gouttes), le *Micrococcus agilis* (19 à 20 gouttes). Si, au contraire, le microbe est nettement alcalinisant dans ses cultures, il faut remplacer l'alcali par un acide (acide sulfurique à 1,225 p. 100); c'est le cas du *Spirille du choléra* (1/2 à 1 goutte), du *Spirille de Finckler et Prior*, du *Spirille de Metschnikoff*, du *Bacille pyocyanique* (5 à 6 gouttes). Pour le *Bacille du lait bleu*, il faut mélanger les solutions alcaline et acide dans la proportion de 15 gouttes de la première pour 20 gouttes de la seconde et faire agir ce mélange.

On verse une grosse goutte du bain ainsi modifié sur la lamelle préparée, tenue avec une pince de Debrand, et l'on chauffe au-dessus d'une petite flamme pendant une demi-minute à une minute au plus, en évitant avec soin l'ébullition; il faut que le liquide émette seulement des vapeurs. On lave à l'eau distillée et à l'alcool absolu.

On porte les préparations dans un bain colorant ainsi composé :

Eau d'aniline.............................	100 centimètres cubes.
Solution de soude à 1 p. 100..............	1 centimètre cube.
Violet de gentiane ou fuchsine............	4 à 5 grammes.

Une goutte de la solution est placée sur la lamelle que l'on chauffe doucement pendant une minute. On lave à l'eau, on laisse sécher et l'on monte.

(1) Loeffler, Eine neue Methode zum Färben der Mikroorganismen in besonderen ihrer Wimperhaare und Geisseln (*Centralbl. für Bakt.*, VI, 1887, p. 209). — Id., Weitere Untersuchungen über die Beizung und Färbung der Geisseln bei den Bakterien (*Ibid.*, VII, 1890, p. 625).

Il se produit fréquemment, dans les préparations, des précipités granuleux qui fixent le colorant et empâtent le tout, empêchant de distinguer les cils.

2° *Méthode de Nicolle et Morax* (méthode recommandée). — Nicolle et Morax (1) ont avantageusement modifié la manière de faire indiquée par Lœffler. Les lamelles simplement desséchées sont traitées par une grosse goutte de bain mordant préparé, comme l'indique Lœffler, avec du tannin à l'éther de très bonne qualité; on chauffe une dizaine de secondes sur une petite flamme (bec veilleuse). Dès que les vapeurs apparaissent, on lave doucement et l'on recommence deux ou trois fois le mordançage et le lavage. On colore en versant de la fuchsine de Ziehl sur la préparation et en chauffant une ou deux fois pendant un quart de minute; on lave et l'on examine dans l'eau. Si la préparation est réussie, on sèche et l'on monte dans le baume.

3° *Méthode de Bunge* (2). — Le mordant est composé de trois parties d'une solution aqueuse saturée de tannin et une partie de solution de perchlorure de fer à 1 p. 20. A 10 centimètres cubes de ce mélange, on ajoute 1 centimètre cube de solution aqueuse concentrée de fuchsine. Le liquide doit être préparé d'avance et laissé à l'air pendant quelques semaines; il prend alors une teinte rouge brun; on le filtre au moment de s'en servir. On y laisse pendant cinq minutes les lamelles simplement préparées par dessiccation. On lave et sèche, on colore ensuite à chaud quelques minutes par la fuchsine phéniquée. Pour employer ce liquide aussitôt, Bunge conseille d'y ajouter quelques gouttes d'eau oxygénée et de filtrer ensuite.

4° *Méthode de Van Ermenghem* (3) (méthode recommandée). — C'est une imprégnation des cils par de l'argent réduit. Traiter les lamelles, fixées par la chaleur, pendant une demi-heure à froid ou de cinq à dix minutes à 60° par le *bain fixateur* :

Acide osmique à 2 p. 100	1 partie.
Tannin en solution aqueuse à 25 p. 100	2 parties.
Acide acétique	4 gouttes.

Laver à l'eau distillée.

Sensibiliser dans une solution aqueuse de nitrate d'argent à 0,5 p. 100 (il est bon parfois d'aller jusqu'à 2 p. 100), pendant une demi-minute à deux minutes, en tout cas jusqu'à ce que la préparation prenne une teinte grisâtre. L'argent se fixe sur les cils et les corps microbiens. Ne pas laver.

Plonger dans un *bain réducteur* ainsi composé :

Acide gallique	5 grammes.
Tannin	3 —
Acétate de soude fondu	10 —
Eau	350 —

(1) Nicolle et Morax, Technique de la coloration des cils (*Ann. de l'Inst. Pasteur*, VII, 1893, p. 554).

(2) Bunge, Ueber Geisselfärbung von Bakterien (*Fortschr. der Med.*, XII, 1894, n° 12). — Id., Weitere Mittheilungen über Geisselfärbung (*Ibid.*, XII, 1894, n° 24).

(3) Van Ermenghem, Nouvelle méthode de coloration des cils de Bactéries (*Travaux du laboratoire d'hygiène et de bactériologie de l'Université de Gand*, I, 1893).

Y laisser la préparation pendant une ou deux minutes; laver ensuite à l'eau distillée; la préparation a une nuance dorée.

Repasser la préparation dans la solution argentique, en agitant constamment, jusqu'à ce que la solution se mette à noircir; on arrête alors et on lave à l'eau distillée.

Si la coloration n'est pas assez intense, traiter encore une fois par le bain réducteur, puis par la solution argentique.

Colorer à la solution de Ziehl et monter. Les microbes et les cils sont colorés en noir par une véritable imprégnation d'argent.

Stephens (1) modifie le procédé de Van Ermenghem en remplaçant la solution de nitrate d'argent par une solution à 2 p. 100 de largine (combinaison de nitrate d'argent et d'albumine; chez Merck).

5° *Méthode de Bowhill* (2). — Le mordant employé est l'*orcéine*. On mélange parties égales des deux solutions suivantes :

Solution 1.

Orcéine.............	1 gramme.
Alcool absolu.......	50 cent. cubes.
Eau distillée........	40 —

Solution 2.

Tannin..............	8 grammes.
Eau distillée........	40 cent. cubes.

Faire dissoudre à chaud.

Le mélange est fait au moment du besoin et filtré; c'est le bain mordant.

Les lamelles préparées sont mises à nager sur ce bain mordant chauffé doucement, la face préparée tournée naturellement en dessous; elles y sont laissées de dix à quinze minutes.

Laver largement à l'eau et sécher.

On colore ensuite à la solution anilinée de violet de gentiane (p. 376) chauffée jusqu'à dégagement de vapeurs.

Laver, sécher et monter dans le baume.

Cette méthode réussit très bien pour le *Bacille typhique*, le *Proteus vulgaris*, le *Bacillus subtilis*. Pour le *Spirille du choléra*, il est préférable d'ajouter, pour 10 centimètres cubes de mordant, 1 centimètre cube de solution saturée d'alun.

6° *Méthode de Pielfield* (3). — Pietfield a eu l'idée de réunir les deux actions du mordant et du colorant. Il prépare les deux solutions :

Solution A.

Solution aqueuse saturée d'alun....................	10 cent. cubes.
Solution alcoolique saturée de violet de gentiane...	2 —

Solution B.

Solution aqueuse de tannin à 10 p. 100.

Prendre parties égales des deux solutions filtrées et mélanger au moment de s'en servir.

(1) STEPHENS, *The Lancet*, vol. II, 1898, p. 874.

(2) BOWHILL, Eine neue Methode des Bakterien-Geisselfärbung bei Gebrauch einer Orcenbeize (*Hygienische Rundschau*, 1898, n° 1).

(3) PIETFIELD, New Method of staining flagella (*Journ. of the Roy. Med. Soc.*, 1896, p. 133).

Benignetti et Gino, partant du même principe, recommandent la technique suivante :

Solution A.

Sulfate de zinc	1 gramme.
Tannin	10 grammes.
Eau distillée	100 —

Faire une *Solution B* ainsi composée :

Solution A	5 cent. cubes.
Solution aqueuse saturée d'alun	5 —
Solution alcoolique saturée de violet de gentiane	3 —

Déposer sur la lamelle, fixée par la chaleur, une grosse goutte de la solution B ; chauffer sur une veilleuse jusqu'à production de vapeurs ; laver à l'eau et au besoin sécher et monter.

4° *Coloration des capsules.*

Les méthodes de coloration ordinaires ne mettent qu'imparfaitement ou même pas du tout en évidence les capsules que possèdent certains microbes. Le plus souvent, même alors que les microbes prennent fortement la couleur, leurs capsules restent incolores.

La solution fuchsinée de Ziehl réussit d'ordinaire bien, surtout si l'on fait passer la lamelle après coloration dans un bain d'acide acétique dilué (une goutte d'acide acétique pour 5 centimètres cubes d'eau). Les solutions ordinaires de violet, après un lavage très rapide à l'eau, peuvent donner également de bons résultats (1).

On peut aussi employer la *méthode de Ribbert* (2). Les lamelles ou les coupes sont colorées pendant quelques minutes dans le mélange suivant :

Eau distillée	100
Alcool	50
Acide acétique	12,50

que l'on sature à chaud de violet de dahlia. La coloration se fait presque instantanément. Aussi la durée de l'immersion doit-elle être très courte. On lave à l'eau, on sèche et monte. Les microbes sont en bleu foncé, les capsules en bleu clair.

Mac Conkey (3) conseille, pour colorer les capsules, la solution suivante :

Dahlia	0gr,5
Vert de méthyle 00 cristallisé	1gr,5
Solution alcoolique saturée de fuchsine	10 centimètres cubes.
Eau distillée	200 — —

D'après Guarnieri, les capsules se coloreraient légèrement en rose par le réactif de Millon, ce qui indiquerait qu'elles sont de nature albumi-

(1) Pane, Ueber die Genesis der Kapseln des Pneumococcus (*Centralbl. für Bakt.*, t. XXIV, 1898, p. 289).

(2) Ribbert, Zur Farbung der Pneumoniekokken (*Deutsche med. Wochenschr.*, 1885, n° 9, p. 136).

(3) Mac Conkey, *The Lancet*, II, 1898, p. 1262.

noïde. Pour colorer les capsules du *Pneumocoque* dans les coupes de poumon, Friedlaender (1) colore les coupes dans le bain suivant :

Solution concentrée de violet de gentiane............	50 grammes.
Eau	100 — .
Acide acétique	10 —

Il y laisse les coupes pendant un jour et lave avec de l'eau additionnée de 1 p. 100 d'acide acétique. Après déshydratation par l'alcool, les préparations sont éclaircies à l'essence de cèdre et montées dans le baume. Les capsules restent fréquemment colorées, mais d'une nuance beaucoup plus claire que les coccus qu'elles renferment.

5° *Colorations spéciales du Bacille de la tuberculose, du Bacille de la lèpre, du Spirochète de la syphilis.*

Les différentes méthodes employées seront exposées avec détails plus loin, lors de l'étude des espèces en question.

6° *Coloration des microorganismes dans le sang.*

La recherche des Bactéries et en général des divers microorganismes dans le sang peut offrir des difficultés assez grandes qui tiennent surtout à l'abondance des globules rouges masquant facilement les microbes lorsqu'ils sont peu abondants, ce qui arrive le plus souvent (2). Pour remédier à cet inconvénient, Vincent (3), se basant sur ce que les couleurs d'aniline se fixent sur l'hémoglobine et non sur le protoplasma, a imaginé de traiter d'abord les préparations par un réactif dissolvant l'hémoglobine avant de faire agir la couleur. Il s'est arrêté au liquide suivant, qui n'altère pas la forme des globules rouges et ne laisse aucun dépôt :

Solution aqueuse d'acide phénique à 5 p. 100.	6 centimètres cubes.
Eau saturée de chlorure de sodium	30 —
Glycérine	30 —

La lamelle, desséchée simplement à une douce chaleur, est laissée pendant une demi-minute à deux minutes, suivant l'épaisseur de la couche, avec un peu du mélange précédent. L'hémoglobine se dissout entièrement. On lave doucement à l'eau et l'on colore au bleu de méthylène phéniqué, au bleu de Lœffler ou même à l'éosine. Le procédé réussit en particulier très bien pour les formes en croissant de l'*Hématozoaire de Laveran*.

Il y aurait à décrire bien d'autres procédés de coloration, appliqués à des cas spéciaux, qui ont fourni des résultats remarquables. Vu leur

(1) Friedlaender, Mikroscopische Tecknik, 1885, p. 57.

(2) Kuhnau, Ueber die Resultate und die Leistungsfähigkeit der bakteriologischen Blutuntersuchung im Dienste der klinischen Diagnostik (*Zeitschr. für Hygiene*, XXV 1897, p. 492).

(3) Vincent, Sur un nouveau mode de coloration des microorganismes dans le sang (*Soc. de Biol.*, 16 juin 1894).

manque de généralisation, il est préférable de les étudier en même temps que les espèces à l'examen desquelles ils ont été appliqués.

III. — MONTAGE DES PRÉPARATIONS.

Les préparations, sorties du dernier bain colorant et débarrassées d'excès de liquide par lavage, doivent être examinées avant leur complet achèvement. Lorsqu'elles ont été traitées par une solution aqueuse, l'eau peut servir comme véhicule; quand elles sont sèches ou qu'elles ont été lavées à l'alcool, on se sert de xylol ou d'huile d'aniline.

Celles qui sont jugées satisfaisantes, et dont on veut faire des préparations durables, sont alors montées dans un liquide conservateur ou bien dans le baume du Canada ou la résine Dammar.

La *glycérine*, si utile en histologie, n'est que rarement employée; elle dissout assez vite les couleurs d'aniline, sauf les bruns qu'elle conserve parfaitement. Les Bactéries colorées à la fuchsine, au violet ou au bleu, y deviennent en peu de temps très pâles ou incolores. Elle est à recommander, au contraire, dans les cas particuliers où l'on colore à la vésuvine, pour la photographie par exemple. La gélatine glycérinée (1) offre les mêmes inconvénients, quoique à un degré moindre. Ces deux substances ont le grand défaut d'être très réfringentes; les Bactéries incolores ou peu colorées s'y distinguent mal.

La solution concentrée d'*acétate de potasse* (acétate de potasse, 1 gramme; eau, 2 grammes), indiquée par Schultze (2) et appliquée par Koch à l'étude des Bactéries, est un excellent liquide conservateur, qui doit avec raison mériter la préférence. Les colorations, surtout celles à la fuchsine et aux violets, s'y conservent aussi vives qu'au début; de plus, elle gonfle légèrement la membrane des Bactéries, qui y reprennent à peu près les dimensions qu'elles avaient avant la dessiccation. Ce liquide est du reste d'un usage aussi commode que la glycérine; très hygroscopique, il ne sèche pas facilement; il est recommandé d'attendre vingt-quatre heures pour luter les préparations. Son indice de réfraction est inférieur à celui de la glycérine; les objets transparents y paraissent bien plus nets.

Les préparations dans les milieux liquides sont fermées avec les luts ordinaires, cire à cacheter dissoute dans l'alcool, la paraffine, etc.

On emploiera plus fréquemment le *baume du Canada* ou la *résine Dammar*, dissous dans le xylol et pas dans le chloroforme, qui a le grave inconvénient de dissoudre les couleurs d'aniline et de faire pâlir au bout de peu de temps les préparations. Bolles Lee et Henneguy (3) recommandent également pour les couleurs d'aniline la solution de *colophane* dans la térébenthine à indice de réfraction moins élevé que celui du baume et de toute confiance pour la durée. Après lavage à l'alcool et dessiccation, il est souvent utile de traiter les lamelles ou les coupes par un réactif *éclaircissant*.

L'*essence de girofle*, employée dans ce but en histologie, dissout les

(1) Ch. ROBIN, Traité du microscope, 1re édition, p. 250. Paris, J.-B. Baillière.
(2) SCHULTZE, *Arch. für mikr. Anat.*, 1872, p. 180.
(3) BOLLES LEE et HENNEGUY, Traité des méthodes techniques de l'anatomie microscopique. Nouvelle édition. Paris, Doin.

couleurs d'aniline; aussi ne doit-on la laisser agir que très peu de temps et l'enlever avec du papier buvard dès que l'effet est obtenu. Il est préférable de se servir d'*essence de cèdre* ou, mieux, *de bergamote*, qui ne présentent pas le même inconvénient. L'excès d'essence enlevé avec du buvard, on dépose à sa place une goutte de baume et l'on monte comme d'habitude. La face de la lamelle qui porte le dépôt coloré doit naturellement être appliquée *sur* le porte-objet et être imprégnée du produit conservateur. Il est parfois difficile de la reconnaître de l'opposée, lorsqu'elle n'a conservé que de minces parcelles peu colorées de substance à examiner. Aussi peut-il être avantageux de marquer au début le côté préparé d'un petit trait au diamant qui sera un excellent guide. Avec de l'habitude, on arrive vite à s'orienter. La couche colorée présente un aspect terne et un reflet métallique facile à apercevoir, même lorsqu'il est très faible, en éclairant la lamelle par réflexion.

RÉSUMÉ DU MANUEL OPÉRATOIRE

Nous croyons utile de passer sommairement en revue les diverses opérations nécessaires à la préparation des Bactéries dans les liquides ou dans les tissus, dont la description détaillée a été donnée dans ce chapitre.

Recherche des Bactéries dans les liquides. — Une goutte du liquide est placée sur un couvre-objet *parfaitement propre*, à l'aide d'un fil de platine ou d'une baguette de verre préalablement passés dans la flamme, puis refroidis. Le liquide est étalé en couche très mince. Les liquides très riches en Bactéries devront être dilués avec de l'eau distillée pure de germes. L'emploi de la centrifugation (p. 361) est souvent à recommander. Si c'est une culture épaisse qui est à examiner, on en délaye une parcelle dans une goutte d'eau pure. Si l'on a affaire à des liquides épais, visqueux, comme du sang, du pus, des crachats, on les étale en stries sur la lamelle avec la pointe du fil de platine, de façon à avoir des couches suffisamment minces, ou on les écrase entre deux lamelles, que l'on sépare en les frottant l'une sur l'autre. Les lamelles sont séchées à une douce température à l'abri de la poussière, la face chargée tournée en haut.

La mince pellicule obtenue par dessiccation est fixée en passant par trois fois la lamelle, tenue à l'aide d'une pince fine, dans la flamme bleue d'un bec de Bunsen ou d'une lampe à alcool, lentement, de la manière indiquée page 367.

La lamelle est déposée sur le bain colorant (p. 372) contenu dans un verre de montre ou un godet, froid ou chauffé vers 50°-60°, la face préparée tournée en dessous, de façon qu'elle soit complètement mouillée par le liquide, sans bulles d'air interposées. La coloration demande un temps variable suivant la préparation; on en surveille les progrès en soulevant de temps à autre la lamelle avec des pinces.

La préparation est lavée à grande eau jusqu'à ce qu'elle ne cède plus de couleur. Lorsque la couche colorée se délite, ce qui peut arriver avec les liquides qui ne contiennent pas de matières coagulables ou avec certaines espèces qui ne se collent que difficilement à la lamelle ou d'autres qui se décolorent très vite, il faut éviter de laver: l'excès du bain colorant est enlevé avec du papier buvard.

On procède alors à la décoloration, si elle est nécessaire, en agitant la lamelle dans de l'alcool absolu ou plus ou moins étendu, et en arrêtant, par un lavage à l'eau qui doit souvent être immédiat, par l'évaporation de l'alcool qui mouille la lamelle, si l'action est lente, ou en déposant sur la lamelle une goutte de solution d'acide azotique au tiers et passant rapidement à l'eau dès que la coloration vert jaune apparaît, pour faire agir de nouveau du réactif si la décoloration n'est pas suffisante (p. 384). On peut alors traiter par un bain différent pour obtenir une double coloration qui est souvent nécessaire lorsque le liquide contient d'autres éléments que l'on veut étudier (p. 386).

La préparation, lavée à l'eau, est montée dans l'acétate de potasse, ou lavée rapidement à l'alcool absolu, séchée, éclaircie à l'essence de girofle et montée au baume.

Recherche des Bactéries dans les tissus. — Lorsque les tissus sont gorgés de sucs, on peut, en les exprimant ou les raclant avec un scalpel, obtenir du liquide renfermant des Bactéries, qui sera traité comme il vient d'être dit. A part ce cas spécial, il faut débiter les tissus en coupes minces, à l'aide de microtomes.

Si l'on veut étudier des tissus frais ou des tissus insuffisamment durcis, pour ne pas trop prolonger l'action de l'alcool, on les coupe après une congélation moyenne obtenue à l'aide des appareils usités dans les laboratoires, principalement de pulvérisations d'éther.

D'habitude, les organes à examiner sont mis à durcir par petits morceaux dans les liquides employés dans ce but en histologie.

Les tissus durcis sont débités en coupes le plus minces possible à l'aide de microtomes.

Les coupes sont traitées comme il a été dit précédemment (p. 389), puis déshydratées par l'alcool absolu, éclaircies à l'essence de girofle et montées dans le baume.

DES CAUSES D'ERREUR DANS LA RECHERCHE ET L'EXAMEN DES BACTÉRIES

Il n'existe guère d'organismes inférieurs dont la forme pourrait prêter à confusion. Tout au plus pourrait-on citer quelques spores secondaires de certains Champignons, de très petite taille et en bâtonnet; leur germination en un filament mycélien établira une distinction bien nette. Les cellules de *Levures*, les filaments de mycélium des *Moisissures* se reconnaîtront à leur aspect et à leurs dimensions. Les cultures pures, du reste, fourniront un critérium de toute sûreté.

La grande ressemblance de beaucoup de granulations, qui se rencontrent dans les préparations avec des *Micrococcus*, pourrait plutôt induire en erreur. Dans les différents procédés employés pour la fixation des Bactéries, il se produit souvent, sous l'influence des réactifs, des précipités de matière protéique, affectant la forme de granules arrondis, de très petites dimensions, absorbant fortement les couleurs. On en obtient surtout lorsqu'on soumet à la fixation dans la flamme de gaz des pellicules d'évaporation dont la dessiccation n'a pas été bien terminée à basse température. Ehrlich a fait observer que les solutions de couleurs d'aniline ajoutées à un liquide de réaction alcaline précipitent sous forme de granulations colorées qu'on pourrait prendre pour

des Bactéries sphériques; c'est une raison qui fait abandonner l'emploi des alcalis dans les colorations et les fait remplacer, uniquement ou presque, par l'huile d'aniline. Il est rare que les granulations ainsi produites ne se reconnaissent pas, à un examen attentif, par l'irrégularité de leurs formes et les différences souvent très grandes qu'elles présentent dans leurs diamètres. En effet, tandis que chez les *Micrococcus* les cellules sont parfaitement sphériques, homogènes et présentent, à très peu de chose près, les mêmes dimensions, ces précipités renferment des éléments très irréguliers, de forme et de grosseur excessivement variables. Lorsqu'on peut les pratiquer, les cultures différencient vite un précipité inerte d'un qui contient des Bactéries; une quantité infinitésimale du dernier féconde une culture qui reste stérile avec l'autre.

Il en est de même des granulations de différentes substances albuminoïdes qui s'observent presque toujours dans le sang ou les tissus, pouvant provenir de la dissociation de certains éléments, surtout des noyaux.

Les granulations *basophiles* de certains leucocytes ressemblent souvent beaucoup à des *Microcoques*. On les en distingue en se basant sur leur coloration plus lente, sur leur décoloration plus facile, sur leurs contours moins réguliers, et enfin sur l'inégalité de leur diamètre.

Il y a moins fréquemment méprise pour les Bactéries en bâtonnets. Cependant des traînées de fibrine coagulée peuvent affecter la forme filamenteuse. Celli et Guarneri ont signalé dans les crachats la présence, assez rare il est vrai, de cristaux allongés d'acides gras, retenant fortement la matière colorante, pouvant être pris, à un examen trop rapide, pour des *Bacilles de la tuberculose*. La forme en est caractéristique; il suffit d'être prévenu. Ils s'éclairent du reste très vivement dans la lumière polarisée, ce que ne font pas les Bactéries.

Des cristaux d'oxalate de chaux, des cristalloïdes de matières albuminoïdes, spermine ou autres, peuvent en imposer pour des Bactéries. Les derniers sont gonflés par les alcalis et dissous dans une solution salée de pepsine; les premiers sont solubles dans les acides forts.

Les résultats de l'observation peuvent être faussés par l'introduction de Bactéries étrangères avec les milieux employés. Les solutions aqueuses des matières colorantes fourmillent souvent de Bactéries au bout de quelque temps. C'est la principale raison pour laquelle il faut leur préférer des bains préparés d'une façon extemporanée avec des solutions alcooliques concentrées, de conservation parfaite, dont on ajoute quelques gouttes à la quantité d'eau nécessaire. De plus, la récolte du liquide à examiner demande des précautions rigoureuses, indiquées à propos des cultures pures.

Les procédés de coloration employés ne conviennent parfois pas à l'espèce en question; on peut donc être conduit à nier la présence de Bactéries dans un milieu qui en contient réellement. La seule chose à conseiller est de modifier les manipulations dans tel sens qu'on jugera bon et de ne se prononcer définitivement qu'après avoir épuisé la série des méthodes reconnues comme bonnes. C'est ainsi qu'on n'a trouvé le *Bacille de la tuberculose* qu'après que Koch eût annoncé la possibilité de le colorer avec les solutions alcalines.

Enfin, des illusions d'optique ou des erreurs d'observation peuvent faire croire à la présence de formes autres que celles qui se trouvent

réellement dans la préparation. Les bâtonnets se placent souvent de champ, soit isolés ou en piles; ils paraissent être des éléments sphériques. Des bâtonnets courbés peuvent donner l'apparence de bâtonnets à deux spores, les extrémités de l'image semblant plus foncées que la partie médiane qui est simple. L'étude consciencieuse d'une préparation mettra en relief la forme normale de l'espèce qui s'y trouve et fera revenir sur les déterminations prises trop hâtivement.

Certaines humeurs d'Invertébrés, le liquide du cœlome des Vers de terre par exemple (Cuénot), contiennent en abondance de fins éléments en bâtonnets qui peuvent être aisément pris pour des Bactéries, d'autant plus qu'ils se colorent facilement aux couleurs d'aniline. L'addition d'une petite quantité d'alcali lève rapidement les doutes : ces bâtonnets, de nature grasse ou albuminoïde probablement, se dissolvent vite.

Dans les formes en bâtonnets, le protoplasma se contracte souvent, sous l'influence des réactifs employés et aussi lorsque la cellule est vieille, en deux amas qui peuvent se toucher sur la ligne médiane ou n'être séparés que par un faible interstice, lorsque le bâtonnet est court. Des espèces de petite taille offrent cet aspect à l'état vivant : on l'attribue ici à une condensation du protoplasma plus forte aux deux pôles. Beaucoup de *Diplocoques*, de formes en *biscuit à la cuiller*, en *haltères*, en *8 de chiffre*, n'ont pas d'autre origine. Les plus forts grossissements sont nécessaires pour faire distinguer l'aspect véritable.

Le protoplasma des cellules qui souffrent ou qui sont mortes change fréquemment d'aspect. Il se forme parfois dans son intérieur de grosses vacuoles qui ne se colorent pas et qui ont été prises pour des spores. Le bâtonnet entier peut même ne plus prendre de substance colorante ou se colorer d'une teinte beaucoup plus claire que des voisins encore en vie.

V. — MÉTHODES BIOLOGIQUES

Le développement des microbes dans les organismes vivants, ou également l'introduction chez ces derniers des produits qu'ils forment, y déterminent des modifications profondes et variées qui ont été étudiées précédemment (p. 120). Ces modifications portent, en bonne partie, sur les humeurs ou sur des éléments de l'organisme dont certains apparaissent comme beaucoup plus sensibles que les autres à l'influence microbienne. Elles donnent lieu à des réactions variées dont l'origine et aussi le but ont été discutés plus haut (p. 129).

Ces réactions, qu'opèrent principalement les microbes vivants, peuvent aussi s'observer sous l'influence des produits qu'ils forment, soit produits diffusant dans le milieu, soit produits fixés d'une façon plus stable aux corps microbiens, sous l'influence des microbes morts même. Elles peuvent être utilisées dans un but de recherches. Leur constatation permet d'affirmer la présence des éléments que l'on sait les déterminer, des microbes qui leur sont spéciaux, même en dehors de la constatation directe de ces microbes, l'existence de leurs effets, des maladies qu'ils occasionnent. C'est pourquoi on doit les considérer comme des véritables procédés de recherche microbienne. Les réactions observées sont toutefois sous la dépendance d'influences trop variées et trop complexes, comme tous les phénomènes biologiques, pour qu'on puisse en

espérer toujours des résultats d'une exactitude rigoureuse. Elles deviennent forcément ainsi des méthodes d'approximation plutôt que de certitude absolue.

1° AGGLUTINATION ET PRÉCIPITATION

Dans les humeurs des organismes soumis à l'action microbienne, il se forme des substances spéciales, les agglutinines (p. 137) et les précipitines (p. 142), qui déterminent sur les microbes ou certains de leurs produits des phénomènes de coagulation particuliers. A vrai dire, ces réactions ne peuvent pas être considérées comme étant d'une spécificité absolue (p. 141); leur utilisation pour le diagnostic n'est donc pas tout à fait infaillible. Toutefois, dans la pratique, en tenant compte de conditions particulières d'observation, on peut retirer de leur recherche des éléments des plus précieux pour le diagnostic.

Elles peuvent, du reste, servir tout aussi bien, et cela se comprend aisément, selon que l'on dispose de l'un ou l'autre élément, microbe ou humeur influencée, et que l'on cherche à se renseigner sur le correspondant, soit au diagnostic du microbe, soit au diagnostic de l'état du sérum, c'est-à-dire, s'il y a lieu, à celui de l'infection qui a pu l'influencer dans le sens déterminé.

Réaction d'agglutination et sérodiagnostic.

Dans beaucoup d'infections, la propriété agglutinante apparaît dans le sang dès le début de la maladie, progresse jusqu'à un maximum avec l'évolution de celle-ci, puis diminue et peut disparaître ou persister même longtemps après la guérison. Il y a ici de nombreuses variations à ce schème, qui seront citées à propos de l'étude des divers microbes.

La propriété agglutinante existe dans d'autres humeurs que le sang. On la constate dans le lait, les larmes, les urines, le pus, diverses sérosités, etc. C'est surtout dans le sang qu'on la recherche, parce qu'elle y semble généralement plus marquée et plus constante et qu'il est aisé de se procurer de ce liquide. La technique à suivre est d'ailleurs identique dans tous les cas. C'est du sérum sanguin qu'on se sert dans la grande majorité des cas, d'où le nom de *sérodiagnostic* qui a été appliqué à la méthode. Étudié dans tous ses détails à l'occasion de la fièvre typhoïde et du *Bacille typhique*, le sérodiagnostic a été étendu à beaucoup d'autres infections et à de nombreuses espèces microbiennes et est devenu aujourd'hui un procédé général de diagnostic.

Pour le mettre en œuvre, il faut disposer de sang d'un côté, de l'autre côté de microbes. L'un ou l'autre de ces deux éléments doit être parfaitement déterminé; c'est-à-dire que, si l'on veut identifier un microbe, il faut disposer d'un sang infectieux de nature certaine, ou plutôt d'un sérum d'animaux immunisés à l'égard de l'infection que l'on vise, d'un *immunsérum* sûr; si, par contre, on veut identifier un sang ou un sérum, il faut disposer d'une culture appropriée d'un microbe bien déterminé.

Nous allons d'abord examiner le cas le plus simple où l'on doit se servir de sang fraîchement recueilli et d'une culture vivante. Après,

nous verrons la manière de faire dans les cas un peu plus complexes où l'on ne dispose que de sang desséché ou de microbes morts.

Recueil du sang. — Il se fait par l'un des procédés indiqués page 313. Le plus souvent, on a recours à la simple piqûre du doigt (p. 313). On obtient facilement une petite quantité de sang, de quelques gouttes à 1 ou 2 centimètres cubes, qui doit être recueillie au mieux dans un petit tube de verre, stérilisé d'avance si possible et fermé par un bon bouchon ou aspiré dans un tube à vaccin fermé à la lampe aux deux extrémités après. On peut user aussi du procédé de la ventouse (p. 314), qui donne alors une quantité plus grande de sang que l'on recueille d'après les mêmes principes.

Le sang peut être employé en entier, quand il est resté liquide et que l'examen est fait immédiatement. Pour le sérodiagnostic rapide au microscope, il y a alors l'inconvénient du grand nombre des globules, qui gênent l'agglutination et peuvent rendre difficile l'observation des amas. Il vaut mieux laisser la coagulation se faire, c'est du reste ce qui se produit lorsque l'examen n'est fait que quelque temps après la prise du sang, et faire la recherche de l'agglutination avec le sérum.

On peut user du procédé rapide d'examen au microscope ou du procédé lent d'examen macroscopique.

1° *Sérodiagnostic rapide au microscope.*

C'est de beaucoup le procédé le plus employé dans la pratique courante et le plus commode à mettre en œuvre, parce qu'il n'exige qu'une très petite quantité de sang ou de sérum.

Deux alternatives peuvent se présenter. Ou bien on possède une culture bien déterminée et l'on doit rechercher si un sérum a à son égard un pouvoir agglutinant net, ce qui indique alors le microbe en question comme agent d'infection. Ou bien on veut mettre en œuvre un sérum agglutinant réellement spécifique, et rechercher s'il agglutine un microbe que l'on désire identifier. Voyons d'abord le premier cas.

Il faut une culture possédant des qualités spéciales, très pure d'abord, puis ayant les éléments microbiens bien dissociés, ne formant pas entre eux d'amas, bien homogène.

On arrive surtout à ces conditions avec des cultures jeunes. Pour le *Bacille typhique*, par exemple, il faut prendre des cultures en bouillon, de dix à vingt heures, vingt-quatre heures au plus : on peut s'en servir dès que le trouble est bien uniforme. Il est toujours indispensable d'examiner au microscope, avant de s'en servir, la culture que l'on veut employer ; s'il y existait des amas, pouvant provenir d'une sorte d'agglutination spontanée, elle est impropre à la recherche ; il faut en obtenir une autre dans des conditions meilleures. Parfois, des cultures plus âgées ne montrent pas d'amas ; on peut alors s'en servir.

Si l'on part d'une culture sur gélose, il faut la choisir âgée de vingt-quatre heures pour les microbes qui se développent vite. On prélève une öse prise de préférence aux bords de la culture et on délaye dans un centimètre cube de bouillon stérilisé ; le mélange se comporte comme une jeune culture en bouillon. Il peut y avoir avantage à prendre des cultures sur gélose ; certains microbes croissent plus facilement en longs filaments articulés ou en longues chaînes dans le bouillon, alors

que, dans les cultures sur gélose, leurs éléments sont beaucoup plus dissociés.

Il est des espèces dont les cultures à éléments très agglomérés en voiles, en écailles, en masses compactes, sont peu propices ou même impropres à montrer la réaction agglutinante. Parfois, il faut y renoncer. D'autres fois, on peut parvenir, en usant de certains artifices, à transformer une culture agglomérée en culture dissociée propre à servir. C'est, par exemple, le cas pour le *Bacille de la tuberculose*, qui donne sur le bouillon un voile épais et sur gélose une couche assez résistante. Arloing et P. Courmont sont parvenus à en obtenir des cultures dissociées dans le bouillon, des *cultures homogènes*, en soumettant les cultures à l'agitation, en agitant fortement les tubes de bouillon au moins une fois par jour, soit à la main, soit à l'aide d'un agitateur mécanique; après quelques passages en bouillon glycériné, on obtient des cultures à éléments régulièrement dissociés dans le milieu. On peut recourir aussi à un long broyage de la culture dans un mortier stérilisé, suivi d'une mise en émulsion dans du bouillon stérilisé.

L'examen au microscope est fait plus commodément avec un fort objectif à sec.

Avant tout, quel que soit l'état de la culture employée, il est absolument nécessaire de l'examiner d'abord au microscope, pour voir si elle ne contient pas d'amas spontanés, se rendre compte de l'état de dissémination et de densité de ses éléments, de leur degré de mobilité, si elle existe.

Lorsque tout est satisfaisant, il est possible de procéder à la réaction.

En seconde hypothèse, on peut chercher à identifier une culture microbienne en usant d'un sérum dont la propriété agglutinante est certaine.

Le sérum peut provenir d'un malade bien reconnu antérieurement. Le plus souvent, il provient d'un animal immunisé à l'égard du microbe que l'on recherche; c'est un *immunsérum*. Tous les immunsérums ne sont pas agglutinants; pour les obtenir bien agglutinants, il faut faire intervenir les corps microbiens dans l'immunisation. Les sérums purement antitoxiques, obtenus à l'aide de toxines seules, ne possèdent aucun pouvoir agglutinant ou agglutinent seulement faiblement, à moins que les cultures ne soient restées longtemps à l'étuve, qu'il y ait eu contact prolongé avec les corps microbiens. On peut faire provision des sérums nécessaires, en immunisant un petit animal dans les conditions voulues, recueillant le sang et distribuant aseptiquement le sérum par petites quantités. Ou bien on s'adresse à des laboratoires qui préparent en grand de tels sérums agglutinants, l'Institut Pasteur, de Paris, ou l'Institut bactériothérapique et vaccinal suisse, de Berne, par exemple, ou même au commerce, en éprouvant soigneusement d'avance les produits fournis. Si le sérum employé contient quelques globules rouges, ces derniers ne gênent en rien l'agglutination; ils facilitent même plutôt la mise au point pour l'examen.

La manière de procéder est la même, que l'on recherche à identifier un microbe ou à reconnaître la nature d'un sérum.

Il faut mélanger des quantités de sérum et de culture et voir s'il se produit une agglutination.

Les proportions du mélange donnent le *taux* de l'agglutination.

La manière de faire la plus commode est celle qui a été instituée par Widal (1) pour le sérodiagnostic de la fièvre typhoïde.

On mélange dans un verre de montre une goutte de sérum à 9, 29, 49, 99 gouttes du liquide de culture. On a ainsi des dilutions à 1/10, 1/30, 1/50, 1/100. Dans la pratique, on peut se contenter d'abord des dilutions à 1/10 et 1/30, puis, s'il y a agglutination, chercher alors plus loin, arriver même, si l'on veut mesurer exactement le pouvoir agglutinant, à 1/1000 et au-dessus.

Au lieu de gouttes, on peut prendre des fractions plus petites, une öse de fil de platine, par exemple. On prélève 9 öses de liquide de culture dans des conditions aussi similaires que possible ; on les dépose successivement sur un verre de montre ou sur une lamelle porte-objet, en rangées ou en cercle ; puis, avec la même öse passée préalablement dans la flamme et refroidie, on prend une öse de sérum que l'on dépose au centre ; on repasse le fil à la flamme et on mélange bien le tout ; avec le mélange, on fait des préparations.

Pour plus de facilités, on peut, au préalable, diluer le sérum en en mélangeant une goutte à 4 ou 9 gouttes d'eau, et avoir ainsi des dilu-

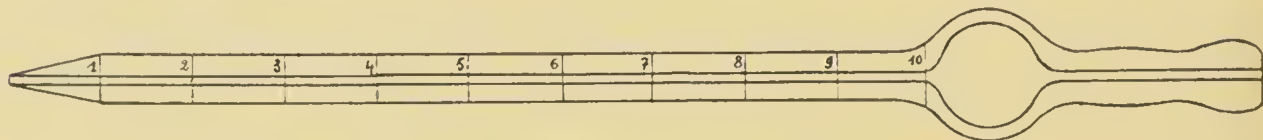


Fig. 186. — Pipette-mélangeuse pour sérodiagnostic.

tions à 1/5 ou 1/10. Il est facile de calculer le taux d'agglutination sur ces bases.

Pour arriver à une mensuration absolument exacte, le mieux serait d'employer de petites pipettes comme celle de la figure 186, jaugées au 1/10 de centimètre cube dans la partie effilée, portant comme mélangeur un renflement de 2 centimètres cubes. Avec un tube de caoutchouc placé à l'extrémité terminale, on aspire exactement 1/10 de centimètre cube de sérum ou d'une dilution de sérum au taux connu, puis 9 divisions du liquide de culture. Une aspiration suffisante fait pénétrer le tout dans le réservoir ; on agite bien pour mélanger complètement, et, en soufflant, on dépose sur les lames des quantités de liquide suffisantes pour les préparations.

Le liquide sur porte-objet est recouvert d'une lamelle et la préparation est examinée au microscope.

L'agglutination, si elle se produit, peut être instantanée ; dans ce cas, on peut même distinguer à l'œil nu des grumeaux dans le mélange. Le microscope montre de gros amas et pas ou peu de microbes libres. Elle peut ne se produire que lentement et graduellement, sous l'œil de l'observateur au microscope, demander même un temps assez long, un quart d'heure, une demi-heure, une heure même ; être complète ou incomplète ; dans ce dernier cas, il reste des microbes libres en dehors des amas de ceux qui sont agglutinés, microbes qui peuvent même rester encore mobiles s'ils l'étaient auparavant. Ce sont là des caractères

(1) Widal et Sicard, Étude sur le sérodiagnostic et sur la réaction agglutinante chez les syphilitiques (*Ann. de l'Inst. Pasteur*, XI, 1897, p. 353).

de plus à noter. D'amples détails seront d'ailleurs donnés lors de l'étude des espèces, surtout de celles qui peuvent intéresser plus spécialement à ce point de vue.

2° *Sérodiagnostic lent macroscopique.*

Ce procédé est moins rapide et peut-être moins sensible que le précédent ; toutefois, pour certaines espèces, il paraît mieux réussir.

Le sang ou le sérum doivent être recueillis aseptiquement, l'apport de microbes étrangers pouvant troubler les résultats des cultures.

A un tube contenant 10 centimètres cubes de bouillon stérile, on ajoute 10 gouttes du sérum, puis on ensemence avec une öse d'une culture de microbe. En même temps, on fait un tube témoin, sans sérum. On porte à l'étuve à 37°. La culture est normale dans le tube témoin ; s'il y a agglutination, on constate qu'il se forme, dans le tube contenant du sérum, d'abord de légers grumeaux, puis, après vingt ou vingt-quatre heures, de véritables flocons qui se déposent au fond du tube alors que le liquide s'est éclairci tantôt partiellement, tantôt d'une façon complète. Ces grumeaux ou ces flocons sont plus ou moins gros ; ils peuvent être très fins, difficiles à saisir à l'œil nu, il faut alors l'examen microscopique comparé des deux tubes, décelant les amas d'agglutination dans le tube à sérum.

On peut aussi ajouter le sérum à une culture en bouillon déjà développée, âgée de un à plusieurs jours, selon les conditions de développement du microbe ; on a intérêt à la prendre jeune, pour éviter les amas spontanés. On ajoute une dizaine de gouttes de sérum et on met à l'étuve. La culture devient grumeleuse après quelques heures, puis, graduellement, les flocons deviennent plus nets, se précipitent, le liquide peut même s'éclaircir tout à fait.

En ensemençant plusieurs tubes de 10 centimètres cubes de bouillon avec des quantités variables de sérum, 1, 2, 3,... 10 gouttes, on peut ainsi arriver, par un petit calcul, à déterminer un taux d'agglutination macroscopique.

Pour user moins de sérum, on peut en faire des dilutions dans l'eau physiologique à 1/10, 1/50, 1/100, et agir sur de petits tubes contenant 1 centimètre cube de bouillon de culture ou d'émulsion de culture sur gélose.

L'examen doit être fait au bout de deux à quatre heures, puis de vingt-quatre heures. La formation des amas peut ne se saisir qu'avec une certaine direction d'éclairage ou en faisant varier l'incidence. Une température supérieure à 37° peut favoriser l'agglutination ; Kutscher recommande d'opérer à 55° pour le *Méningocoque.*

Sérodiagnostic avec le sang desséché. — Le sang desséché peut conserver son pouvoir agglutinant ; le sang typhique le garde longtemps. On peut dessécher le sang sur une lame de verre, c'est le meilleur moyen, ou sur du buvard, en le versant par gouttes. On dissout les taches dans quantité égale, ou connue, d'eau distillée et on opère avec la dissolution. On emploie aussi le sérum desséché en poudre en dissolvant la poudre dans de l'eau distillée stérilisée dans la proportion de 1 de poudre de sérum pour 9 d'eau, 0gr,10 de poudre pour 0gr,90 d'eau. Ces solutions ne se gardent pas.

Sérodiagnostic avec des microbes morts. — Des cultures mortes peuvent garder assez longtemps leur propriété d'être agglutinées. On peut se servir de cultures tuées par le formol. Widal et Sicard indiquent la manière de faire suivante pour le *Bacille typhique* : A une culture en bouillon, âgée de vingt quatre heures, ne montrant à l'examen microscopique que des microbes bien disséminés et pas d'amas, on ajoute du formol à 40 p. 100 en proportion de 2 gouttes pour 15 centimètres cubes de culture. La culture ainsi traitée garde pendant plusieurs semaines son aptitude à l'agglutination. Pour l'usage, on l'agite fortement et on procède comme avec une culture vivante. Koeppen, pour le *Bacille tuberculeux*, préconise le traitement par la potasse à 33 p. 100. On peut aussi employer des cultures traitées par la chaleur, le séjour une demi-heure ou une heure à 60°. On trouve dans le commerce des émulsions de microbes morts qui peuvent donner des résultats, pendant un certain temps au moins, tel le *Typhusdiagnosticum* de Ficker.

Mensuration du pouvoir agglutinant.

Le taux du mélange de sérum et de liquide microbien donne le rapport cherché.

Pour arriver à une mensuration exacte, il faut naturellement que les quantités de chacun des deux produits soient exactement mesurées ; on y arrive en employant des pipettes compte-gouttes vérifiées, ou mieux la pipette-mélangeuse qui a été décrite (fig. 186, page 408).

En pratique, on essaie d'abord des taux élevés, 1 p. 10, puis graduellement 1 p. 50, 1 p. 100 et au-dessus.

Le taux d'agglutination peut, du reste, varier dans de grandes limites, de 1 p. 10, 1 p. 30, à 1 p. 1 000, 1 p. 10 000 et au-dessus.

Il faut savoir que le pouvoir agglutinant peut être assez long à apparaître après le début de l'infection ; pendant, il peut plus ou moins varier d'intensité. Il y a peu de données générales encore à établir sur ce point, mais plutôt des détails particuliers dont il sera parlé à propos des espèces intéressantes à connaître à ce point de vue.

Réaction de précipitation.

On a vu (p. 142) qu'à côté des agglutinines il se trouve, dans les immunsérums, d'autres corps d'une spécificité relative aussi, les précipitines. En ajoutant une petite quantité de tels sérums à une culture en bouillon, bien clarifiée par filtration, du microbe qui intervient dans leur formation, ou à des liquides organiques où ce microbe a vécu, on peut voir se former un précipité floconneux ou pulvérulent, ou simplement le liquide se troubler (réaction de Krause, précipito-réaction). Il ne se produit rien de semblable avec du sérum normal ou des sérums provenant d'autres infections. Quelquefois, cependant, on obtient une précipitation pour des infections dues à des microbes très voisins, le *Méningocoque* et le *Gonocoque*, par exemple.

La technique à employer est la suivante :

Dans une série de petits tubes, de 3 à 5 millimètres de diamètre, on met une quantité égale du liquide microbien filtré jusqu'à transparence complète, 1, 2 ou 5 centimètres cubes, selon ce dont on dispose.

A chacun des tubes, on ajoute 1, 2..., 5 ou 6 gouttes de l'immunsérum, laissant un tube témoin sans sérum. On met à l'étuve à 37°, mieux, pour certaines espèces, à 55°. On observe de douze à quinze heures après. Souvent déjà, dans un cas positif, il s'est produit un louche dans les tubes additionnés de sérum, le tube témoin restant clair. Le louche s'accentue ; après vingt-quatre heures ou plus, on peut observer des petits flocons se sédimentant au fond.

Le tube témoin peut se troubler de son côté ; il est alors difficile d'user de la réaction. L'exposition à 55° sert surtout à empêcher un trouble dû à une pullulation microbienne dans le liquide renfermant encore des microbes à la suite de la filtration.

On doit reconnaître que la spécificité de cette réaction est moins nette encore que la précédente. On peut l'obtenir aussi en dehors de la présence de tout sérum spécifique, en faisant intervenir certains produits organiques.

Des détails plus circonstanciés seront donnés lors de l'étude des quelques types microbiens à propos desquels on a lieu de la rechercher, le *Méningocoque* et le *Spirochète de la syphilis* surtout.

2° POUVOIR OPSONISANT

Wright a imaginé une technique spéciale, sa *méthode opsonique*, pour arriver à mesurer le pouvoir opsonisant d'un sérum. C'est le moyen de se rendre compte de l'action que ce sérum peut exercer sur la phagocytose, par conséquent sur les moyens de défense de l'organisme et sa résistance à une infection déterminée ; c'est aussi le moyen de se renseigner, dans le même but, sur l'effet que peuvent produire des procédés d'immunisation et de vaccination (Voy. page 145).

Il s'agit, en somme, de réaliser *in vitro* la phagocytose du microbe dont il est question et d'estimer son degré.

Il faut, pour cela, disposer de leucocytes, d'une émulsion microbienne obtenue d'une culture, du sérum dont on veut déterminer le pouvoir et la force opsonisants. Ces trois éléments sont mélangés en parties égales : le mélange est laissé à l'étuve à 37° pendant quinze à vingt minutes pour permettre l'action des leucocytes ; on en fait des préparations colorées d'après la technique habituelle ; on compte les microbes contenus dans 50, 100 ou mieux 150 leucocytes, et on fait une moyenne. Ce chiffre moyen, le *coefficient phagocytaire*, est le *pouvoir opsonisant* du sérum pour les leucocytes et les microbes employés. Pour en tirer des conclusions, il faut le comparer au pouvoir opsonisant d'un sérum normal, celui de l'opérateur, par exemple, s'il est tout à fait sain, pour lequel on opère de même et on détermine la même moyenne.

L'*index opsonique* est le rapport qui existe entre le chiffre moyen, le pouvoir opsonisant du sérum à examiner, et le chiffre moyen, le pouvoir opsonisant du sérum normal. On conçoit que c'est le rapport entre la puissance phagocytaire des leucocytes actionnés par un sérum d'individus en état d'infection et la puissance phagocytaire de ces mêmes leucocytes actionnés par un sérum normal.

Ainsi, avec les constatations suivantes faites sur différents sérums :

Sérum normal : $\dfrac{150 \text{ microbes}}{100 \text{ leucocytes}} = 1,5$ de moyenne.

1er sérum à examiner : $\dfrac{400 \text{ microbes}}{100 \text{ leucocytes}} = 4$ de moyenne.

2e sérum à examiner : $\dfrac{100 \text{ microbes}}{100 \text{ leucocytes}} = 1$ de moyenne.

les index opsoniques seront :

Pour le 1er sérum : $\dfrac{4}{1.5} = 2.666.$

Pour le 2e sérum : $\dfrac{1}{1,5} = 0.666.$

Les objets nécessaires pour cette opération sont : un instrument pour la prise du sang, lancette, aiguille, vaccinostyle, pipette effilée (Voy. p. 313) ; quelques pipettes bien étirées, une étuve ou un petit bain-marie à 37°, une émulsion de leucocytes, une émulsion de microbes, du sérum normal et du sérum à examiner ; en plus, de la *solution physiologique* (solution normale : NaCl, 0,85 p. 100 d'eau distillée), des colorants et ce qui est nécessaire pour l'examen microscopique. Quelques détails sont nécessaires pour les éléments fondamentaux de la réaction, leucocytes, microbes et sérums.

Leucocytes. — On peut s'en procurer de différentes origines.

On recueille l'exsudat péritonéal d'une grenouille, trois heures après l'injection dans le péritoine de quelques centimètres cubes d'un mélange à parties égales de bouillon et de solution physiologique. On centrifuge et on lave deux fois, par centrifugation, le culot à la solution physiologique.

On prélève, à la seringue stérilisée, de l'exsudat péritonéal d'un cobaye, quatre ou cinq heures après l'injection dans le péritoine de quelques centimètres cubes de bouillon, de solution physiologique, de solution d'aleurone, de gélatine. On centrifuge ; on lave deux fois le culot à la solution physiologique, par centrifugation.

Le mieux est de recourir aux leucocytes du sang humain. On s'adresse à un homme sain, le plus souvent l'opérateur lui-même ou l'un de ses aides. Le doigt est piqué comme il a été dit page 313. On laisse tomber le sang goutte à goutte dans un petit tube contenant quelques centimètres cubes d'une solution de citrate de soude à 1,5 p. 100 dans l'eau physiologique, en évitant de faire tomber les gouttes sur les bords du tube. On cherche à recueillir de la sorte environ 1 centimètre cube de sang, et on agite fréquemment, mais doucement, pour bien mélanger. Le mélange est centrifugé à une vitesse moyenne, pendant dix à quinze minutes, dans un tube à fond effilé. On recueille la couche de leucocytes avec le moins possible de globules rouges qui, plus denses, se sont sédimentés au fond et restent assez adhérents, en inclinant le tube et aspirant les leucocytes avec une pipette étirée munie d'une petite boule de caoutchouc ; ces leucocytes sont portés dans un tube contenant de la solution physiologique. Après une douce agitation, on centrifuge une seconde fois. Le culot est lavé à nouveau à la solution physiologique ; il est fait une troisième centrifugation. L'amas de leucocytes est alors, au moment du besoin, émulsionné dans une petite quantité de solution physiologique, au moyen d'une simple agitation opérée doucement.

On peut même opérer sur la totalité du culot obtenu après la première centrifugation, en mélangeant soigneusement, pour chaque lavage et

surtout au moment de s'en servir pour la réaction, par une agitation douce et longue, globules blancs et globules rouges. On trouve d'ordinaire, dans les préparations, un nombre suffisant de leucocytes; mais la recherche et la numération sont forcément un peu plus longues.

Émulsion microbienne. — Elle est obtenue d'une culture de l'espèce qui détermine l'infection en vue de laquelle on opère la réaction. Pour être bonne, l'émulsion ne doit pas être épaisse et être très homogène. On choisit, de préférence, une culture sur gélose âgée de vingt-quatre heures environ, les cultures âgées pouvant déterminer de la phagocytose spontanée. Une petite quantité de culture est émulsionnée le mieux possible par agitation dans de la solution physiologique. L'émulsion ne doit pas contenir trop de microbes, ce qui gênerait; elle doit n'offrir qu'une très légère opalescence, et, en préparation microscopique ordinaire, ne montrer que des individus bien isolés et pas trop nombreux, pour pouvoir être comptés facilement dans un champ de microscope. Les quantités de culture et de solution seront aisément déterminées par ces conditions. Une petite pratique met d'ailleurs très vite à même d'arriver vite. Pour les microbes qui ne se dissocient pas facilement, il faut alors recourir à la trituration au mortier d'agate avec la solution physiologique, puis passer à travers un linge fin pour ne pas avoir de grumeaux. La technique devra naturellement se modifier selon les particularités des cultures dont on voudra user.

Pour le *Bacille tuberculeux*, Wright recommande de prendre d'une culture en bouillon âgée d'un mois à un mois et demi, les vieilles cultures renfermant souvent des amas filamenteux difficiles à dissocier. On stérilise à 110°, filtre sur papier et lave les bacilles à la solution physiologique. Le dépôt est ensuite broyé au mortier et émulsionné au mieux avec de l'eau salée à 1,5 p. 100 pour éviter toute phagocytose spontanée, en l'ajoutant goutte par goutte. On centrifuge légèrement, pour enlever les grumeaux. On dilue convenablement avec de l'eau salée à 1,5 p. 100, et répartit dans de petits tubes que l'on stérilise à 115°. Une telle émulsion peut se conserver longtemps; avant de se servir d'un tube, on l'agite fortement, puis on le laisse quelques minutes en repos pour faire déposer les grumeaux qui ont pu se former et n'en pas trouver dans le liquide supérieur.

Sérums. — On doit faire intervenir du sérum à examiner et du sérum normal.

On recueille dans un petit tube quelques gouttes du sang du malade par piqûre du doigt, ou bien de celui d'animaux d'expérience par piqûre de l'oreille. La coagulation se fait. Le sérum est soutiré dans une pipette effilée; il faut, pour cette dernière partie, éviter les globules rouges qui nuisent au pouvoir opsonique. Le sérum peut être conservé en pipette scellée pendant une huitaine de jours, ou mieux à la glacière, sans que le pouvoir opsonisant diminue sensiblement.

Pour le sérum normal, on procède de la même façon sur la personne ou l'animal choisi.

Technique de la réaction. — On mélange parties égales d'émulsion de leucocytes, d'émulsion microbienne et de sérum. Pour cela, on se sert avantageusement de petites pipettes dont la partie étirée a au moins 5 à 6 centimètres de calibre régulier, terminées par une section bien nette; cette partie est marquée d'un index à l'encre ou au crayon gras

de 1 à 2 centimètres de l'extrémité. Le gros bout est muni d'une petite tétine de compte-gouttes en caoutchouc. Le maniement se conçoit facilement. On aspire d'abord de l'émulsion microbienne, bien agitée, jusqu'à l'index; puis on introduit un peu d'air, sur une longueur d'un centimètre à peu près; ensuite une quantité égale à la première, jusqu'à l'index, de l'émulsion de leucocytes, suivie d'une bulle d'air à peu près semblable à la précédente; enfin, jusqu'à l'index aussi, du sérum à employer. Il est à recommander d'opérer toujours exactement dans l'ordre indiqué qui est le préférable. On mélange alors le tout, par une série de projections et d'aspirations successives, sur un verre de montre ou sur une lamelle; puis le tout est aspiré dans la queue de la pipette que l'on ferme à la lampe et place dans l'étuve à 37°. On fait successivement, absolument dans les mêmes conditions, une telle pipette en se servant du sérum à examiner et une autre en se servant du sérum normal; on les met à l'étuve en même temps.

Les pipettes sont retirées après quinze ou vingt minutes. Successivement, on en casse l'extrémité; le contenu est de nouveau bien mélangé sur un verre de montre par quelques aspirations; on en fait alors des préparations. Une gouttelette est déposée sur un porte-objet, de préférence à surface dépolie au papier d'émeri comme le recommande Wright, puis bien étalée, au mieux en se servant d'une lame de verre à section très nette. Les leucocytes seront plus nombreux à la fin de la partie étalée; c'est là que la numération sera plus facile; mais il est nécessaire que l'étalement soit suffisant pour n'en pas avoir, ou peu au moins, de superposés. C'est un point délicat qui s'apprend vite à la pratique. On sèche la préparation à l'air, fixe par la chaleur, l'alcool ou le sublimé, colore suivant les indications, selon l'espèce microbienne à examiner. On use le plus souvent de thionine ou de bleu.

Pour le *Bacille tuberculeux*, la technique est plus compliquée : Wright conseille de fixer pendant une minute à la solution saturée de sublimé, colorer au Ziehl, décolorer à l'acide sulfurique à 2,5 p. 100, traiter par l'acide acétique à 4 p. 100 pour détruire les globules rouges, laver et donner une coloration de fond avec le bleu de Kühne.

La préparation est examinée, on passe en revue 100 ou 150 leucocytes, en notant pour chacun le nombre de microbes qu'ils renferment, ceux qui n'en contiennent pas étant chiffrés 0; puis on fait la moyenne. Certains leucocytes peuvent renfermer trop de microbes, qui deviennent impossibles à compter; c'est surtout quand l'émulsion microbienne était trop riche en microbes; si ces leucocytes sont peu nombreux, on fait une numération approximative; Wright conseille même de les marquer toujours 9 ou 10; s'ils sont nombreux, il faut recommencer l'opération en usant d'une émulsion plus diluée. On réussit au mieux quand on ne trouve que quelques microbes par leucocyte, 2 à 5 par exemple, au moins pour l'opération qui porte sur le sérum normal.

On établit facilement les numérations et les chiffres qui ont été indiqués précédemment (p. 412).

Lorsqu'on veut utiliser les données fournies par cette méthode, il est bon de se souvenir qu'elle comporte des irrégularités et quelques causes d'erreur dont la plus importante est la variation du nombre des leucocytes chez des individus différents et aussi chez le même individu suivant l'état du sang.

3° FIXATION DU COMPLÉMENT

La présence dans un sérum, ou dans une autre humeur organique, d'une sensibilisatrice (ambocepteur) déterminée entraîne forcément, à cause de la spécificité absolue de cette dernière (p. 136), l'action, sur l'organisme d'où provient le sérum, de l'antigène rigoureusement correspondant à l'anticorps sensibilisatrice. Par conséquent, la constatation d'une telle sensibilisatrice doit déceler l'antigène correspondant. Le fait importe beaucoup pour la détermination microbienne. La constatation d'une sensibilisatrice microbienne dans un sérum indique que le microbe qui en est l'antigène, ou les produits que ce microbe peut former, ont agi sur l'organisme qui a fourni le sérum. Inversement, si un microbe produit dans un organisme une réaction correspondant à un antigène donné qui est un microbe connu, il y a identité des deux types microbiens. On conçoit que l'on peut tirer de ces principes de précieux renseignements pour la détermination des microbes et le diagnostic de leurs actions.

Bordet et Gengou (1) ont démontré que les antigènes, dans le cas particulier les microbes ou leurs toxines, influencés par la sensibilisatrice correspondante qui est spécifique, ont le pouvoir d'absorber, de retenir, de *fixer* l'alexine (complément) contenue dans un sérum mis en contact avec eux: c'est la *réaction de fixation de Bordet-Gengou*. Si, dans ces conditions, on fait intervenir une réaction qui nécessite, pour devenir positive, la présence d'alexine libre, cette réaction ne se produit pas. Elle se produirait, au contraire, si la fixation d'alexine (complément) n'avait pas eu lieu par le microbe, c'est-à-dire si la sensibilisatrice spécifique pour lui n'existait pas dans le mélange.

La réaction que l'on choisit, pour servir dans ces conditions, est une *réaction d'hémolyse*. Si l'on injecte dans le péritoine ou les veines d'un animal des globules rouges d'un animal d'une autre espèce, le sérum du premier animal acquiert assez rapidement la propriété d'hémolyser, de faire éclater et dissoudre les globules rouges de la seconde espèce. En mélangeant sérum et globules, on obtient très vite la réaction, on a un liquide clair, transparent, plus ou moins coloré en rouge selon la quantité de globules employés.

Pour obtenir un tel *sérum hémolytique*, on peut procéder de la façon suivante. Du sang de mouton défibriné est centrifugé; le dépôt de globules rouges est lavé trois fois à la solution physiologique et centrifugé chaque fois. Le dépôt de globules est recueilli. Il sert pour l'injection au lapin et aussi pour la recherche de l'hémolyse. Les globules ainsi obtenus se conservent pendant quelques jours, pas trop longtemps, car ils deviennent fragiles en vieillissant et peuvent se dissoudre spontanément. On injecte dans les veines d'un lapin 2 centimètres cubes d'une suspension concentrée de globules dans la solution physiologique. On recommence une deuxième injection après six jours, puis, six jours après, une troisième en n'injectant que 1cc,5 à cause de l'anaphylaxie ; cette troisième injection doit en outre, pour la même cause, se faire lentement. Dans cette opération, sous l'influence de l'antigène

(1) Bordet et Gengou, Sur l'existence des substances sensibilisatrices dans la plupart des sérums antimicrobiens (*Ann. de l'Inst. Pasteur*, XV, 1901, p. 289).

spécial, globules rouges du mouton, il s'est formé dans le sérum du lapin injecté un anticorps spécifique, une sensibilisatrice particulière, qui a la propriété de se fixer sur les globules rouges de mouton neufs, de les influencer d'une façon spéciale, de les mordancer (p. 136), les disposant à subir l'action de l'alexine (complément) présente dans tout sérum. L'action combinée de cette sensibilisatrice et de l'alexine détermine l'hémolyse, la dissolution de ces globules. On recueille le sang aseptiquement et on en provoque la coagulation pour ensuite séparer le sérum. En chauffant ce sérum à 56° pendant une demi-heure, on en détruit l'alexine, thermolabile, alors qu'on en respecte la sensibilisatrice, thermostabile (p. 136). Si l'on vient à mettre un tel sérum chauffé en présence de globules rouges de mouton, l'hémolyse ne peut plus se faire; on a là un *système hémolytique inactivé*. Pour rendre ce mélange actif, pour que l'hémolyse s'y fasse, il faut lui ajouter de l'alexine (complément), par exemple un peu de sérum normal qui en contient toujours.

Le sérum du lapin sensibilisé aux globules rouges du mouton, comme il vient d'être dit, est réparti aseptiquement en petites ampoules; conservé à la glacière et à l'abri de la lumière, il garde très longtemps son activité.

Le sérum normal que l'on fait intervenir pour rendre de l'alexine au mélange est surtout du sérum de cobaye, riche en alexine. Il doit être frais autant que possible. Son activité diminue rapidement à la lumière et à la chaleur. A la glacière, il peut conserver ses propriétés au moins pendant huit jours. Desséché sur du papier à filtrer, il conserverait ses propriétés beaucoup plus longtemps; on dissout dans un peu de solution physiologique.

Ces données acquises, on est en mesure de procéder. Les règles générales sont les suivantes.

Si l'on vient à mélanger un antigène, microbes ou toxines microbiennes dans le cas particulier, et un sérum d'immunisation contenant par conséquent une sensibilisatrice spécifique, chauffé préalablement à 56° pour détruire son alexine (complément), la sensibilisatrice se fixera sur l'antigène s'il lui est spécifiquement correspondant, s'il représente le microbe ou la toxine qui sont intervenus dans l'infection ou l'immunisation de l'organisme dont il provient. En ajoutant au mélange du sérum normal, de cobaye par exemple, contenant de l'alexine (complément), cette alexine, sous l'influence de la sensibilisatrice, sera fixée sur l'antigène, sur les microbes ou la toxine. Si l'on vient alors à ajouter le système hémolytique inactivé, le mélange de sérum de lapin chauffé et de globules (p. 415), l'hémolyse ne se produira pas, puisqu'il n'y a pas d'alexine libre; dans le tube où l'on a opéré, on aura un liquide clair provenant du mélange des sérums et un dépôt de globules rouges.

Si, au contraire, la sensibilisatrice n'était pas spécifique pour l'antigène, elle ne l'influencerait pas, et ne serait pas capable de fixer l'alexine (complément) qui resterait libre dans le milieu et pourrait se porter alors sur les globules rouges du système hémolytique inactivé, l'activer, l'hémolyse se produirait; le liquide du tube serait coloré en rouge.

C'est là la *réaction de fixation du complément* (ou de l'alexine). Le terme de *déviation du complément* est moins propre; le complément ou alexine, étant indifférent, se fixe toujours sur ce qui l'attire d'abord,

sans prédilection, sans but, n'est par conséquent pas *dévié* d'une destination déterminée.

Il faut remarquer que c'est bien une *réaction rigoureusement spécifique*, alors que les précédentes, réactions d'agglutination, de précipitation, d'opsonisation, n'ont qu'une spécificité relative. Elle peut donc rendre de grands services pour la détermination.

Les sensibilisatrices n'existent pas seulement dans le sérum, mais dans bien d'autres liquides de l'organisme immunisé ou infecté, urine, lait, humeur aqueuse, sérosités pleurale, péritonéale, péricardique, exsudats divers, etc. On peut les utiliser pour rechercher la réaction, mais le sérum donne des résultats plus constants.

Pour la mise en pratique, il est nécessaire d'observer une certaine proportion entre les quantités des divers réactifs employés. Il n'est pas encore possible d'établir des règles générales de technique sur ce point; suivant l'espèce microbienne que l'on vise, les doses à choisir semblent variables; il en sera question lors de l'étude des principales espèces pour lesquelles la recherche de la réaction paraît surtout être d'un grand intérêt.

Il est nécessaire, par contre, avant de disposer l'expérience, de faire une série d'essais, de vérification, des réactifs employés, pour éviter d'importantes causes d'erreur. Il faut s'assurer que les globules ne s'hémolysent pas spontanément, que le sérum normal de cobaye est réellement bien pourvu d'alexine; on doit enfin opérer d'une façon comparative dans un tube témoin, en remplaçant l'immunsérum par un sérum normal quelconque chauffé aussi à 56°, pour s'assurer que l'alexine, non fixée alors sur l'antigène qui n'a pas été influencé par sa sensibilisatrice, hémolyse bien les globules rouges employés.

Comme exemple, on peut donner la technique établie par Widal et Le Sourd pour la recherche de la réaction de fixation du complément dans le sang des typhiques.

On mélange, dans un petit tube de 5 centimètres de long sur 7 millimètres de large environ, 9 gouttes du sérum du malade, préalablement chauffé une demi-heure à 56°, et 5 gouttes d'une émulsion de *Bacilles typhiques* faite en délayant une culture sur gélose de vingt-quatre heures dans 3 à 4 centimètres cubes de solution physiologique; on ajoute 2 gouttes du sérum normal non chauffé; on laisse en contact pendant au moins une heure dans l'étuve à 37°. Ensuite on ajoute 2 gouttes d'un mélange de 1 partie de globules rouges de mouton et 2 parties de sérum de lapin sensibilisé à l'égard de ces globules rouges, ainsi qu'il a été dit p. 416, sérum qui a été chauffé à 56°; on laisse une demi-heure à 37°. Si le premier sérum est bien spécifique, est bien un sérum typhique, l'alexine du sérum normal de cobaye sera fixée par les Bacilles d'Eberth et ne pourra pas produire l'hémolyse dans le système ajouté en second lieu : le liquide ne sera pas coloré, les globules formeront un dépôt. Si le sérum n'est pas spécifique, n'est pas du sérum typhique, cette alexine ne se fixera pas sur les microbes, pourra agir sur le système ajouté en second lieu, l'hémolyse se produira ; le liquide sera coloré en rouge, les globules rouges seront détruits.

La manière d'agir peut légèrement varier suivant l'espèce ; c'est une courte pratique qui indiquera les proportions les plus favorables pour chacune d'elles. Il en sera question à leur étude particulière.

La recherche de la réaction de fixation du complément a été appliquée par Wassermann au diagnostic de la syphilis, dans des conditions un peu spéciales qui seront exposées et discutées lors de l'étude du microbe de cette infection.

4° RÉACTION DES ÉLÉMENTS ET DES TISSUS A L'ÉGARD DES TOXINES OU DES MICROBES

Lors des infections, il se produit, dans le sang et dans les humeurs des organismes attaqués, des modifications portant sur les éléments figurés qui s'y trouvent. Dans le sang, les divers éléments peuvent être affectés, mais d'une façon quelque peu inconstante. Le nombre des globules rouges diminue d'ordinaire ; il y a *hypoglobulie* parfois très marquée (fièvre jaune, infection puerpérale, rhumatisme articulaire aigu). Mais les variations portent surtout sur les éléments leucocytaires, qui ont ici une très grande importance en raison de leur rôle de défense, particulièrement leur activité phagocytaire. Il semble que, d'une façon générale, il y ait *hyperleucocytose*, ce qui correspondrait aux vues admises sur le rôle des leucocytes. Il y a cependant des affections microbiennes où l'*hypoleucocytose* paraît au moins fréquente, sinon régulière (fièvre typhoïde, typhus exanthématique); d'après Achard et Lœper (1), on l'observe aussi à la suite d'inoculation de microbes variés, *Pneumocoque*, *Streptocoque*, *Bacille de Lœffler*, etc., mais jamais lorsque l'opération est faite sur des animaux immunisés. Les toxines déterminent aussi une hyperleucocytose, souvent considérable comme à la suite d'injection de toxine pyocyanique, parfois précédée d'hypoleucocytose passagère, comme avec la toxine diphtérique. Selon le cas, la proportion des divers éléments leucocytaires, surtout pour les lymphocytes, mononucléaires, polynucléaires, leucocytes éosinophiles, se modifie : les uns ou les autres prennent la prépondérance. La prédominance de l'un ou l'autre de ces éléments peut donner d'utiles indications. On arrive par l'examen microscopique ordinaire et la numération de ces éléments, dans les conditions de la technique habituelle, à établir leur moyenne respective; l'ensemble des moyennes constitue la *formule cytologique*. Il semble bien que cette prédominance de l'une ou l'autre des formes soit réellement liée à l'action du microbe qui doit intervenir et qu'on puisse déduire de sa constatation des indications pour se diriger dans un sens déterminé, orienter un diagnostic, d'où le nom de *cytodiagnostic* appliqué à la méthode. Ici, on ne peut pas établir encore de données tant soit peu générales; les résultats observés seront exposés à l'étude des espèces intéressantes à ce point de vue.

Il en est de même des réactions produites dans les tissus sous l'influence de toxines microbiennes diverses. Alors que, chez les individus normaux, de minimes quantités de toxine ne déterminent aucune apparence de réaction, elles peuvent occasionner, chez les individus atteints d'affection correspondante, une réaction notable, souvent forte et facile à distinguer, qu'on est en droit de considérer comme un véritable phénomène d'anaphylaxie. Il peut y avoir là un moyen précieux de diagnostic. Les résultats se limitent jusqu'ici à un petit nombre d'espèces,

(1) Achard et Lœper, La formule leucocytaire dans quelques infections expérimentales (*Soc. de Biol.*, 4 mai 1901).

surtout le *Bacille tuberculeux*, secondairement le *Bacille typhique*. Les procédés à employer seront exposés en détails lors de l'étude de ces espèces et des quelques autres pour lesquelles on peut en retirer profit. Il n'est pas encore possible de généraliser la méthode.

C'est aussi ce que l'on peut dire de l'emploi de l'antitoxine spécifique comme moyen de diagnostic microbien, moyen qui peut réussir pour le *Bacille de la diphtérie* par exemple. En inoculant à un cobaye 1 centimètre cube de sérum antidiphtérique, puis, une dizaine d'heures après, de la culture du microbe dont on veut vérifier la nature, il ne se produit pas de réaction locale si l'on a affaire à un *Bacille diphtérique* vrai, à cause de l'immunité déterminée par le sérum, alors qu'on obtient un œdème plus ou moins prononcé si c'est un *Bacille pseudo-diphtérique* sur lequel le sérum n'a pas d'action. Cette *réaction sérothérapique* est une méthode dont l'emploi est très limité encore; mais le fait peut servir d'indication pour d'autres espèces. Ce fait qu'un sérum d'animal immunisé à l'égard d'une espèce microbienne neutralise réellement les effets avérés d'un microbe ou d'une toxine microbienne est une preuve convaincante de la présence, dans le milieu que l'on a à examiner, du microbe qui a été employé pour obtenir l'immunisation de l'animal, c'est-à-dire l'antitoxine introduite.

TROISIÈME PARTIE

CLASSIFICATION ET DESCRIPTION

Les très nombreuses espèces de Bactéries sont encore loin d'être toutes connues. Il en reste au contraire bien certainement beaucoup à décrire ; de plus, un grand nombre de celles qui ont été décrites le sont d'une façon insuffisante. Aussi doit-on se garder de tenir comme absolues les bases que l'on prend pour établir les groupements proposés. La classification, en effet, ne peut être définitive que lorsqu'on aura décrit, d'une façon suffisamment complète, un bien plus grand nombre d'espèces et qu'on aura surtout déterminé pour chacune d'elles toutes les variations que les changements physiques ou chimiques du milieu, les conditions biologiques, peuvent lui faire subir.

Malgré ses imperfections évidentes, une classification est nécessaire. Certes, il n'est pas à affirmer que celle qu'on croit la meilleure puisse être vraie dans le sens absolu ; tout se transforme trop rapidement dans cette science pour qu'on puisse être certain de la valeur réelle d'un caractère mis au premier rang à un moment donné. Il faut cependant reconnaître qu'un essai de classification sérieuse, ne la considérât-on même que comme tout à fait transitoire, est d'un très grand secours.

Les essais tentés sont assez nombreux. Il faut cependant reconnaître qu'aujourd'hui encore il ne semble pas possible de reconnaître comme supérieure ou définitive l'une ou l'autre des classifications proposées.

Les premiers classificateurs, Ehrenberg et Dujardin (Voy. l'*Introduction*, p. 2 et suiv.), s'en tenaient uniquement à la forme apparente. C'est sur ce caractère que ce dernier observateur établit ses trois genres, caractérisés comme il suit :

Bacterium : filaments rigides, à mouvements vacillants ;

Vibrio : filaments flexibles, à mouvements ondulatoires ;

Spirillum : filaments en hélice, à mouvements rotatoires.

Les formes sphériques étaient, pour la plupart, inconnues ; quelques espèces de son groupe des *Monades* sont cependant des *Micrococcus*.

C'est encore la forme qui sert le plus souvent aujourd'hui de caractère dominant aux classificateurs. Est-ce à dire toutefois qu'elle doive avoir une constance absolue ? Certainement non. Les conditions extérieures, celles de milieu surtout, influent, nous l'avons vu, considérablement sur elle, comme du reste sur les propriétés physiologiques chez beaucoup d'espèces. On doit admettre cependant, et nous insistons sur ce point encore controversé aujourd'hui, qu'il est, pour chaque espèce, une forme en quelque sorte *normale*, une sorte de moyen terme, autour duquel il peut se produire, dans des limites assez restreintes seulement, des variations en plus ou moins, mais auquel l'espèce revient *toujours*,

lorsqu'on la place dans des conditions de vie déterminées qu'on peut considérer comme normales. Il va sans dire que les variations pathologiques désignées sous le nom de *formes d'involution* doivent être complètement mises de côté.

On peut affirmer, à l'heure présente, avec la probabilité la plus grande, qu'il existe chez les Bactéries des espèces vraies, à caractères fixes, se produisant et se perpétuant sans varier. La chose est absolument hors de doute pour quelques-unes. Les *Bacillus anthracis*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus butyricus*, *Bacillus megaterium*, entre autres, ont été très complètement étudiés à ce point de vue et suivis pas à pas pendant des cycles évolutifs nombreux par des observateurs des plus sagaces. Il n'est pas possible de nier scientifiquement la connaissance entière de leur développement. Pour décrire, en effet, avec certitude une espèce, et pouvoir affirmer sa fixité, il faut observer toutes les phases de son développement, partir de la spore et voir en outre les modifications que peuvent apporter les changements physiques ou chimiques des milieux. Il faut se garder des erreurs dues à des observations trop superficielles ou à une technique imparfaite. Bien des observateurs, victimes d'illusions, ont cru voir des liens réels là où il n'y avait que de simples rapports de juxtaposition. De là des simplifications prématurées, dont le type le plus saisissant est la théorie de la *Coccobacteria septica* de Billroth.

Le classificateur doit tenir compte de tous les caractères que l'on peut observer, et suivre, si c'est possible, en entier le développement, en évitant l'introduction d'éléments étrangers, cause si fréquente d'erreurs.

La forme des cellules est un des caractères les plus faciles à apprécier, en observant les précautions voulues. C'est aussi, quoi qu'on en dise, un des plus constants, *à la condition expresse qu'on ne la détermine que sur des individus en état de vie normale.* Ainsi même, dans la pleine période de végétation, lorsque la division se fait rapidement, des articles produits sont toujours de dimensions moindres que celles qui sont regardées comme normales. En règle générale, on peut considérer comme dimensions typiques celles de l'élément qui va sporuler; ce n'est naturellement applicable qu'aux espèces qui forment des spores. Il existe d'ailleurs toujours des variations individuelles dont il faut prendre la moyenne.

Le mode de croissance et de division des individus, les particularités que peuvent présenter leurs différentes parties, sont souvent de grande utilité. La division suivant trois plans de différente direction caractérise on ne peut mieux les *Sarcines* : la production d'épaisses enveloppes de gelée fait très facilement distinguer les *Leuconostoc* et *Ascococcus.*

Chez les espèces qui produisent des spores, on trouve dans les caractères de ces corps reproducteurs des signes d'une précision et d'une constance remarquables. On ne les connaît malheureusement jusqu'alors que dans un nombre assez restreint d'espèces.

La présence ou l'absence des cils vibratiles, leur nombre, leur disposition ont été utilisés comme base de différenciation. Ce caractère ne semble guère avoir la valeur et la constance qu'on a voulu lui attribuer.

L'aspect et le développement des colonies dans les milieux divers fournissent de précieux renseignements. Il faut toutefois avoir grand

soin de ne comparer que des colonies obtenues sur des milieux de composition identique et de tenir compte des modifications déterminées par différentes conditions étudiées précédemment. Le principal changement est la diminution, plus ou moins rapide suivant l'espèce, de la vitalité des cultures après un certain nombre de générations. Nous savons que parallèlement s'atténuent aussi toute une série de propriétés physiologiques importantes, souvent toutes si intimement liées entre elles que lorsqu'une d'elles s'amoindrit les autres diminuent aussi en même proportion.

Pasteur a fait très heureusement entrer en ligne l'action physiologique, qu'il considère comme un caractère spécifique de premier ordre. D'après lui, lorsqu'une Bactérie obtenue pure provoque, dans un milieu déterminé, une fermentation ou une action chimique spéciale qui peut se reproduire à nouveau dans des cultures pures, elle doit être considérée comme une véritable espèce. Ce caractère, cependant, ne peut pas servir à une détermination absolue, plusieurs espèces, bien différentes, pouvant avoir une action semblable. Il faut alors appeler d'autres signes à son aide.

Les exigences particulières de certaines espèces sont parfois d'un très grand secours. Le caractère aérobie ou anaérobie d'une Bactérie est d'autant mieux à remarquer qu'il est très facile à constater, dans les cas typiques du moins.

Enfin, l'action sur l'organisme animal peut rendre d'excellents services. La nocuité ou l'innocuité pour l'organisme et surtout pour tel ou tel animal d'expérience seulement, la nature, la situation, l'étendue des lésions observées, font souvent distinguer des espèces dont les caractères de forme et de culture sont identiques.

Dans un même ordre d'idées, on a cherché, et avec raison, à faire entrer en ligne de compte, pour la constitution des types spécifiques et pour la diagnose des espèces, les réactions qui se passent dans le sang ou les humeurs de l'homme et des animaux en puissance d'invasion par les microbes eux-mêmes ou l'influence des produits qu'ils sécrètent, de leurs toxines principalement. L'expérience démontre que l'on peut en particulier, dans le but précité, tirer grand profit des actions des sensibilisatrices, des réactions d'agglutination ou de précipitation, des propriétés des antitoxines, avec toutes les réserves, cependant, qui ont été émises lors de l'étude de ces substances (p. 135 et suiv.) et de la technique des réactions qui peuvent les faire distinguer (p. 404). Certaines de ces réactions paraissent en effet n'avoir qu'une spécificité trop relative, trop sujette à caution, pour qu'on puisse leur reconnaître une valeur absolue.

En réalité, par exemple, on ne peut pas considérer la *réaction d'agglutination* comme caractère réellement spécifique et surtout comme caractère absolu de diagnose. Si elle fait défaut, il existe de très grandes chances pour que le microbe sur lequel on opère ne doive pas être rapporté à l'espèce qui a été employée pour obtenir le sérum actif avec lequel l'opération a été faite; si elle s'observe, on ne peut pas affirmer être en présence de l'espèce en question, parce qu'il est avéré aujourd'hui qu'un sérum donné peut la provoquer dans des cultures d'autres espèces microbiennes que celle qui a servi à l'obtenir, espèces voisines ou très différentes, et qu'ensuite des substances tout autres

que les sérums, des produits chimiques divers, peuvent la déterminer également. Seulement, généralement les conditions de production de l'agglutination avec ces deux dernières séries de produits, autres sérums que le sérum spécifique et substances chimiques, sont sensiblement différentes; en précisant le plus exactement possible les conditions de l'opération, principalement dose de sérum nécessaire ou temps que la réaction met à se produire, il devient possible de tirer plus grand profit du phénomène (1), sans jamais pouvoir toutefois lui attribuer plus qu'une valeur secondaire.

La spécificité de la *réaction de précipitation* est encore moins réelle.

La constatation d'une sensibilisatrice est un caractère beaucoup plus sûr, sa spécificité étant plus certaine. C'est ce qui fait la valeur de la *réaction de fixation du complément*.

Il en est de même de l'action de l'antitoxine, réellement spécifique sur le microbe ou sa toxine (p. 143). La *réaction sérothérapique* est un caractère très sûr. Aucun des autres caractères invoqués ne saurait avoir l'importance et la constance de celui-ci.

Souvent, cependant, une fonction donnée n'est pas assez constante pour servir de base fixe servant à créer des coupes d'une certaine importance, des genres par exemple. Nous avons vu, en effet, que beaucoup de ces manifestations vitales ne pouvaient être considérées que comme des caractères secondaires, contingents, pouvant même disparaître complètement à un moment donné sans que la vie même de l'espèce soit atteinte. C'est ainsi que bien des espèces chromogènes perdent vite toute propriété de produire du pigment, que des espèces zymogènes deviennent sans action sur les milieux qu'elles font habituellement fermenter, que des espèces pathogènes même deviennent absolument inoffensives pour les animaux les plus réceptifs à leur égard, se transforment, pour ainsi dire, en véritables saprophytes. En général, outre leur contingence, les fonctions diverses, physiologiques, biochimiques ou autres, peuvent rendre de grands services pour la détermination, la fixation des espèces (2) ; elles en rendent bien moins pour la classification parce que des espèces trop évidemment et fondamentalement différentes peuvent agir d'une façon identique.

On se trouve même alors conduit à réunir ensemble des espèces qui possèdent, très marqués, les effets en question, pris comme base de la classification, et des espèces où la fonction, très minime, doit bien certainement être reléguée à un rang très inférieur. C'est ainsi que dans le groupe des *Urobactéries* de Miquel, à côté d'espèces qui sont des ferments énergiques de l'urée, cet auteur a été conduit à placer des espèces très peu actives à ce point de vue, chez lesquelles le caractère, pris comme fondamental, devient difficile à constater, très douteux même et certainement tout à fait secondaire. Il en est de même pour beaucoup d'autres groupements similaires proposés.

Ce sont là les gros écueils des classifications dites *physiologiques*.

En résumé, lorsqu'on a isolé une Bactérie qui, au bout de plusieurs

(1) Grunbaum, Blood and identification of bacterial species (*Science progress*, New series, vol. I, n° 5, octobre 1897).

(2) Grimbert, Diagnostic des Bactéries par leurs fonctions biochimiques. Paris, 1908.

générations, se reproduit toujours identique à elle-même, dont on a observé le développement de spore à spore, dont les propriétés physiologiques sont constantes dans les mêmes conditions, on est en droit d'affirmer qu'on est en présence d'une véritable espèce.

La constance des caractères que nous voyons être au premier rang n'est cependant pas absolue. Il faut faire la part très grande aux conditions de la vie, sous peine d'être amené à séparer des êtres qui doivent être considérés comme semblables. Nous avons vu dans quelles limites et sous quelles influences pouvaient varier les propriétés physiologiques d'une même espèce. La propriété de ferment peut disparaître; la propriété de produire de la couleur, la propriété virulente, peut décroître et s'éteindre; et cependant c'est toujours la même espèce que l'on observe. Mais alors, point important, nous savons qu'il est nécessaire, pour obtenir ce résultat, d'empêcher la formation de spores, c'est-à-dire la véritable extension de l'espèce, et n'obtenir qu'une extension d'individus par multiplication végétative. La spore qui perpétue l'espèce, qui la continue véritablement, ne s'atténue jamais ; les différentes générations, *issues de spores*, ne varieront jamais dans leurs caractères.

La constance de la forme individuelle doit être envisagée au même point de vue. Il ne faut faire entrer en ligne de compte que des individus dont le développement peut être considéré comme s'étant opéré normalement. Sous l'influence de changements de milieux ou de certains agents physiques, une espèce qui donne normalement des bâtonnets de dimensions parfaitement fixes et constantes pourra produire des éléments sphériques ou à peu près, qui seront facilement pris pour des *Micrococcus*. Une autre formera de longs filaments droits ou irrégulièrement courbés ou pelotonnés, qui simuleront des Bactéries filamenteuses ou spiralées. Il est cependant une condition qui servira de guide sûr et aurait dû détourner tout de suite de ces appréciations fautives : c'est le retour constant à la forme primitive typique, lorsque de tels éléments sont placés dans les conditions de vie que l'on est en droit de considérer comme normales.

Inversement, certaines espèces peuvent affecter une forme plus simple et n'offrir le type complet qu'à de rares phases de l'évolution. C'est ainsi que beaucoup de *Sarcines* ne donnent, dans les cultures sur milieux solides surtout, que des coccus séparés, plus souvent unis par deux, ou parfois par quatre; on n'obtiendra que rarement les paquets caractéristiques. Souvent, il ne sera possible de les rattacher au type duquel elles descendent qu'en usant des commémoratifs, la colonie première, on a dû le constater, montrant la vraie forme, spéciale au genre. C'est encore ainsi que chez de nombreuses espèces de *Spirilles* la forme en spirale véritable n'apparaît que dans des conditions spéciales; chez toutes les Bactéries dites *en virgules*, l'élément ne représente qu'une faible portion de circonférence.

C'est en faisant intervenir des agents qui nuisent considérablement à la vitalité de la *Bactérie du pus bleu*, des antiseptiques énergiques, introduits dans les milieux de culture à dose modérée, que Guignard et Charrin (1) ont obtenu les très intéressantes modifications de formes qu'ils ont décrites et dont il sera parlé plus loin.

(1) Guignard et Charrin, Sur les variations morphologiques des microbes (*C. R. de l'Acad. des sc.*, 5 décembre 1887).

Cette facilité de donner des formes différentes a été considérée, par

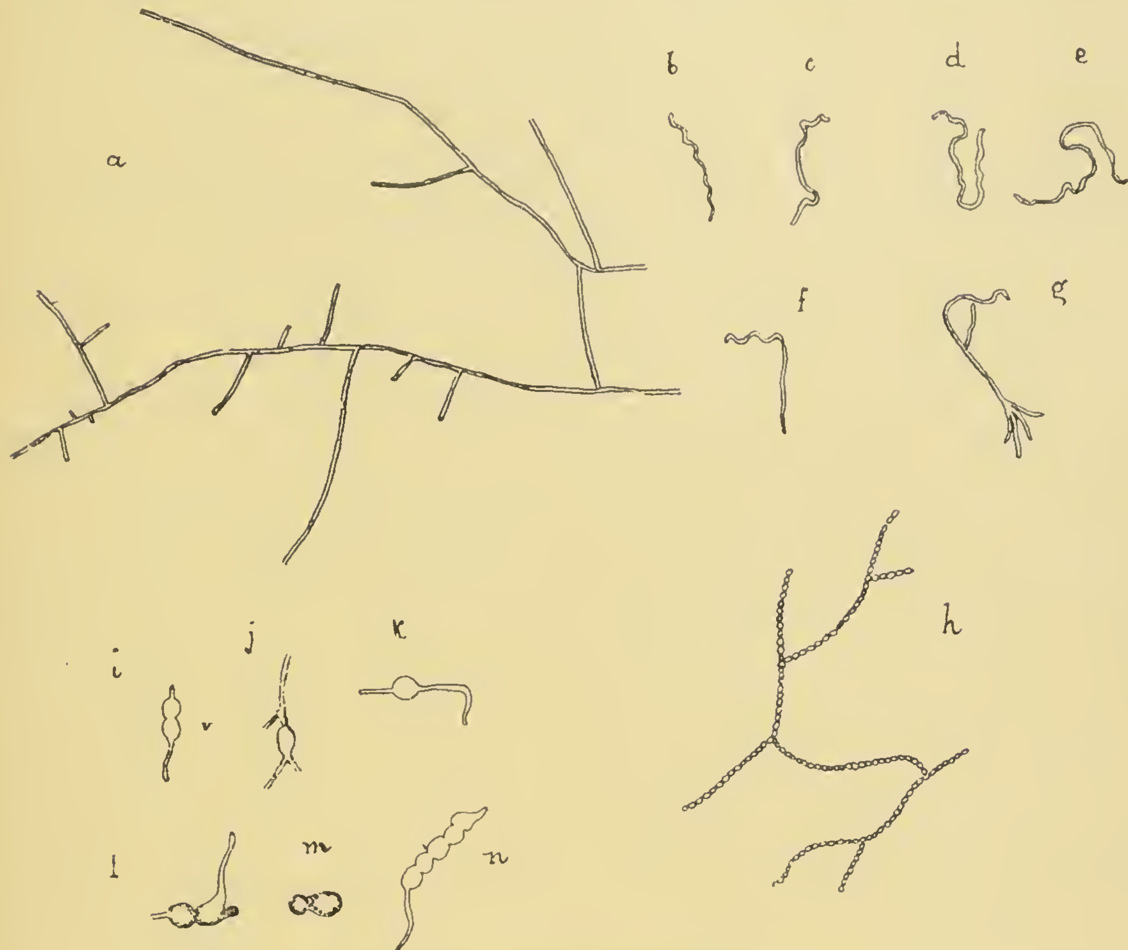


Fig. 187. — *Cladothrix*, 900/1.

a, portion de filament ramifié : *b*, *c*, *d*, *e*, *f*, *g*, parties de filaments diversement contournés ; *h*, filament segmenté en spores ; *i*, *j*, *k*, *l*, *m*, *n*, formes anormales, formes d'involution.

beaucoup d'observateurs, comme étant l'état normal et placée au premier

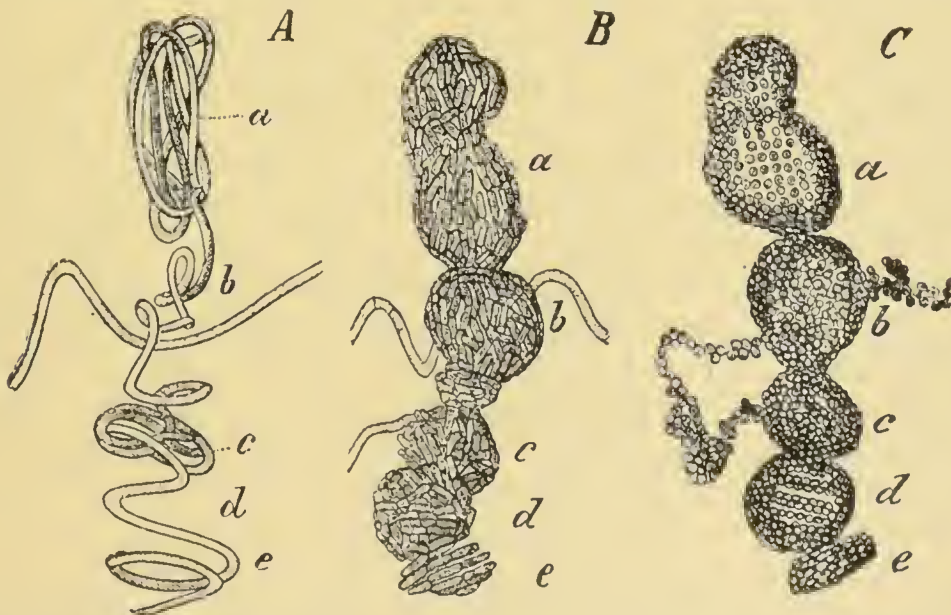


Fig. 188. — *Bacillus Zopfii*, 740/1. — A, filament pelotonné ; B, amas de bâtonnets C, amas de coccus (spores) (d'après Kurth).

rang des caractères spécifiques par les partisans du *polymorphisme* ou *pléomorphisme* des Bactéries. Pour eux, le nombre des espèces de ce

groupe est beaucoup plus restreint qu'on n'est porté à le croire; il n'existerait dans la nature qu'un nombre assez limité de formes spécifiquement distinctes, qui pourraient chacune revêtir, en véritables protées, toute une série de formes secondaires, dépendant du milieu qui leur serait offert. C'est ainsi qu'une espèce qui, dans certaines conditions, aurait des éléments sphériques et devrait dès lors être rangée dans les *Micrococcus*, pourrait, en végétant différemment, donner des bâtonnets, des filaments droits ou spiralés. Chaque espèce posséderait en quelque sorte un cycle d'évolution plus ou moins complet, à formes plus ou moins nombreuses, dans lequel elle pourrait se mouvoir au gré des circonstances.

Zopf (1) a rattaché au développement d'une même espèce, son *Cladothrix dichotoma*, toute une série de formes en coccus, en bâtonnets, en filaments courbés ou spiralés. On a depuis attribué une importance trop générale à cette variété de formes appartenant à un type tout spécial et passablement distinct des autres Bactéries. Les filaments ramifiés, souvent en dichotomie régulière, peuvent être droits ou en partie légèrement courbés ou ondulés, mais non pas véritablement spiralés, comme sur la partie droite de la figure. A un moment donné, la segmentation se fait rapidement ; il se forme, par la segmentation des filaments, des masses rondes auxquelles il ne faut pas donner la signification des coccus, mais plutôt de véritables spores. En examinant les faits sans parti pris, on ne peut vraiment trouver là de raison valide en faveur du polymorphisme, surtout pour la raison suivante : un élément, de forme quelconque du cycle, séparé et mis en culture, fournira toujours du premier coup la forme de filament ramifié, tout à fait caractéristique de cette espèce, celle qui doit être considérée comme normale. Les noms de *Micrococcus*, *Bacillus*, *Leptothrix*. *Spirillum*, dont on s'est servi pour désigner ces phases diverses qu'offre la même espèce (fig. 187), ne doivent pas être employés avec leur véritable signification, mais dans un sens plus général ; il est préférable de les remplacer par d'autres termes moins spéciaux, ne pouvant pas prêter à confusion, tels que *coccus*, *bâtonnets*, *filaments droits*, *courbés ou spiralés*.

Il en est de même pour l'espèce de Bacille décrite par Kurth (2) sous le nom de *Bacterium Zopfii*. Dans les cultures de cette espèce sur milieux solides, on observe fréquemment de longs filaments pelotonnés, dont certaines parties peuvent présenter des ondulations assez régulières, rappelant la forme des longs Spirilles (fig. 188, A). Après peu de temps, ces filaments se segmentent et se transforment en amas serrés de courts bâtonnets (B). Rien d'anormal jusqu'alors ; nous savons que beaucoup de Bacilles vrais peuvent donner des filaments plus ou moins longs ; de plus, beaucoup de bâtonnets se segmentent en articles courts au moment de produire des spores. Dès que le milieu nutritif est complètement épuisé, les masses primitivement formées de bâtonnets se trouvent constituées par des coccus sphériques qui, d'après l'aveu de Kurth, ne se divisent jamais, mais, placées dans des conditions favorables, germent en donnant des bâtonnets semblables aux premiers et, de plus, présentent une plus grande résistance que les autres formes aux conditions de

(1) Zopf, Die Spaltpilze, p. 107.
(2) Kurth, Bacterium Zopfii (*Bot. Zeit.*, 1883).

chaleur et de dessiccation. Ce sont bien là des caractères de spores. Ces éléments doivent, en effet, être considérés comme tels.

Hauser (1) a établi son genre *Proteus* pour des Bacilles présentant des apparences semblables que l'on observe sous la forme de filaments droits ou ondulés, de courts bâtonnets ou de coccus. Mais, comme dans les recherches précédemment citées de Guignard et Charrin, pour obtenir des variations de formes, il faut placer la Bactérie dans des conditions défavorables, en particulier la faire vivre dans un milieu acide. Les formes décrites comme coccus sont, ici aussi, bien certainement des spores ; la forme normale est le bâtonnet. Aucun caractère ne peut encore séparer ces *Proteus* des Bacilles ; la forme spéciale de leur Zooglée et le lent déplacement de ses ramifications dans les milieux visqueux se retrouvent dans d'autres espèces que personne n'a songé jusqu'ici à soustraire du genre *Bacillus*.

Ces considérations ne se rapportent pas uniquement aux Bactéries, mais s'adressent tout aussi bien aux êtres plus élevés ; elles trouvent à tout instant leur application dans les classifications. Pour ne citer qu'un exemple, touchant de près au sujet en question, de ce qu'un *Penicillium* ou un *Mucor* donne, lorsqu'il végète dans un liquide, des articles arrondis, ovoïdes ou en courts cylindres, personne ne sera tenté de comprendre ces formes dans son évolution normale.

D'un autre côté, il n'est guère possible d'admettre une fixité absolue des caractères que l'on considère comme spécifiques. De nombreux exemples (2) prouvent, au contraire, qu'à côté des caractères physiologiques que nous savons variables, les caractères morphologiques eux-mêmes ne nous montrent pas une fixité absolue. Dans des conditions, dont quelques-unes seulement sont déterminées, la forme, les dimensions se modifient, alors que les autres propriétés qui subsistent montrent bien qu'on a affaire à la même espèce. C'est ce qui arrive pour le *Bacille pyocyanique* dans les expériences de Guignard et Charrin ; c'est ce qui arrive pour d'autres espèces pathogènes où l'on est conduit alors à admettre la présence de types divers dans une même espèce, de véritables *races*. Mais ces modifications ne se produisent *que dans des conditions déterminées* et se tiennent entre certaines limites ; elles ne suppriment pas la valeur et l'importance du type spécifique normal, pas plus que les races d'animaux obtenues par l'intervention de l'homme ne peuvent infirmer la notion du type spécifique dont elles sont sorties.

On est donc en droit actuellement d'affirmer l'existence de véritables espèces chez les Bactéries. Pour étudier ou décrire convenablement une espèce, il est nécessaire d'arriver à constater la plupart de ses caractères, tout au moins d'étudier minutieusement ceux qui sont regardés comme étant d'une grande importance, comme fondamentaux. Il est alors grandement à conseiller de suivre le plan d'étude excellent adopté en 1897 par l'Association américaine (3), dont l'exposé suit, en tenant compte

(1) Hauser, Ueber Fäulnissbacterien. Leipzig, 1885.

(2) Rodet, De la variabilité dans les microbes, au point de vue morphologique et physiologique. Paris, J.-B. Baillière, 1894.

(3) Procedures recommanded for the study of Bacteria with especial reference to greater uniformity in the description and differenciation of species. Being the report of a Committee of bacteriologists to the Committee on the pollution of water supplies of the American public health Association. Concord N. H. (*The Rumford Press*, 1898).

des doubles emplois qui figurent et en ajoutant des caractères de valeur qui ont été mis en relief depuis.

Plan proposé pour l'étude des Bactéries.

INDICATIONS ET ÉPREUVES NÉCESSAIRES.

I. Origine et habitat.
II. Caractères morphologiques.
1° Forme.
2° Dimensions.
3° Groupement et arrangement dans les cultures.
4° Coloration :
a. Par les solutions colorantes aqueuses;
b. Par la méthode de Gram.
5° Présence ou absence de capsules.
6° Présence ou absence de cils (motilité).
7° Formation des spores et leurs caractères.
8° Tendance aux variations de formes.
9° Formes d'involution ou de dégénérescence.
III. Caractères biologiques.
A. Caractères de culture et développement dans les milieux suivants
1° Bouillon.
2° Plaques de gélatine (colonies en surface et en profondeur).
3° Tubes de gélatine.
4° Plaques de gélose (colonies en surface et en profondeur).
5° Tubes de gélose.
6° Pommes de terre.
7° Lait.
8° Sérum sanguin.
B. Phénomènes biochimiques :
1° Action de la température (activité du développement à 18°-22° et à 36°-38°. Température mortelle).
2° Action de l'oxygène libre (aérobiose et anaérobiose).
3° Action de l'acidité ou de l'alcalinité du milieu.
4° Action sur la gélatine (présence ou absence de liquéfaction).
5° Action sur les protéides (lait et sérum).
6° Action sur les hydrates de carbone (fermentation et production de gaz).
7° Action sur les nitrates.
8° Production d'indol.
9° Production d'acide ou d'alcali.
10° Formation de pigments.
11° Développement d'odeur.
C. Action pathogène.

ÉPREUVES FACULTATIVES D'UNE UTILITÉ GÉNÉRALE.

I. Morphologie.
1° Coloration avec colorants spéciaux.
2° Coloration des cils par colorants spéciaux.
3° Persistance des caractères morphologiques après un long développement et des transplantations successives sur milieux artificiels.
4° Photographie des Bactéries isolées.
5° Préparations par impression.
II. Physiologie.
A. Caractères de culture et mode de développement dans les milieux suivants :
1° Gélatine tournesolée.
2° Sérum de Lœffler.
3° Milieux chimiquement définis.
B. Caractères biochimiques.
1° Minimum, optimum et maximum de température.
2° Développement dans une atmosphère de gaz inerte.
3° Réaction optima du milieu et limite d'acidité et d'alcalinité (indiquée par la phénolphtaléine).
4° Propriétés chimiques, solubilité et caractères spectroscopiques des pigments.

C. Action pathogène.
1° Inoculation à divers animaux et étude minutieuse des modifications produites.
2° Production de l'immunité.
3° Réaction d'agglutination.
4° Études des substances toxiques produites (aussi bien pour les espèces non pathogènes que pour les pathogènes).

Il faut cependant reconnaître que pour établir une espèce, avec de grandes présomptions au moins, il n'est pas absolument nécessaire de connaître toutes les phases de son développement. Ehrenberg a bien délimité, dans le groupe si nombreux des Infusoires, des genres et des espèces durables, tout en ne connaissant chez eux que la multiplication par division. Il ne faudrait pas croire également que toutes les formes décrites aujourd'hui comme espèces doivent en avoir réellement la valeur. Il est possible que des études approfondies conduisent à rapprocher et à rapporter au même type spécifique des formes que des recherches superficielles avaient tenues éloignées. Mais il est toutefois bien problable qu'on aura plus souvent des résultats inverses à signaler. Beaucoup d'espèces actuelles, c'était déjà l'opinion de Davaine (1), sont des types sous lesquels se cachent plusieurs espèces.

En partant de cette dernière idée, on arrive à reconnaître qu'il existe entre diverses catégories d'espèces des ressemblances très marquées et, en les rapprochant, à constituer ce qu'on peut appeler des *groupes*, où l'on réunit, autour d'une espèce donnée qu'on peut considérer comme chef de file, celles qui semblent s'y rattacher. Quelle peut être la valeur réelle de cette conception ? Il est difficile de se prononcer actuellement. Ces groupes peuvent être les analogues des sous-familles des classificateurs. Ou bien, il peut exister, entre les espèces d'un groupe, des liens plus étroits ; elles peuvent dériver d'un seul et même type primitif, et tendre à s'individualiser par suite de la fixation de certains caractères primitivement transitoires. Tout cela peut, il est vrai, n'être que de simples hypothèses.

Voici les principaux groupements qui paraissent les plus rationnels :

Groupe du *Bacillus subtilis*.

Bacillus subtilis.
Bacillus asterosporus.
Bacillus mesentericus vulgatus.
Bacillus mesentericus fuscus.
Bacillus mesentericus ruber.
Bacillus mesentericus niger.
Bacillus tumescens.
Tyrothrix tenuis.
Tyrothrix distortus.
Bacillus megaterium.
Bacillus mycoides.
Bacillus anthracis.

Groupe du *Bacillus coli communis*.

Bacillus coli communis.
Bacillus typhosus.
Bacilles paratyphiques.
Bacillus enteridis.
Bacillus lactis aerogenes.
Bacillus Friedlaenderi.
Bacillus fæcalis alcaligenes.
Bacillus icteroides.
Bacille de la psittacose.
Bacillus lacticus.
Bacillus actinobacter.
Divers autres *Bacilles capsulés.*

Groupe des *Bacilles fluorescents*.

Bacillus fluorescens liquefaciens.
Bacillus fluorescens putridus.
Bacillus pyocyaneus.
Bacillus syncyanus.
Bacillus chlororaphis.

(1) Davaine, *Dict. encycl. des sc. méd.*, art. Bactéries, 1868.

Groupe des *Proteus*.

Proteus vulgaris.
Proteus mirabilis.
Proteus Zenkeri.
Bacillus Zopfii.

Groupe du *Bacillus tuberculosis*.

Bacillus tuberculosis.
Bacillus lepræ.
Bacillus mallei.
Bacillus diphteriæ.
Bacille du smegma.
Bacilles pseudo-tuberculeux divers.

Groupe des *Septicémies hémorragiques*.

Bacille du choléra des poules.
Bacille de la pneumo-entérite du porc.
Bacille de la peste porcine.
Bacille de la septicémie du lapin.
Bacille de la septicémieides furets.
Bacille de la maladie des chiens.
Bacille de la septicémie hémorragique du cheval.
Bacille de la peste bovine.
Bacillus typhi murium.
Bacille de la peste bubonique.
Bacille de l'influenza.

Groupe du *Vibrion butyrique*.

Bacillus butyricus (type).
Bacillus septicus.
Bacillus Chauvæi.
Bacillus tetani.
Bacillus perfringens.
Bacillus bifermentens sporogenes.
Bacillus putrificus coli.
Bacillus enteritidis sporogenes.
Divers *Clostridium.*
Bacillus botulinus.
Tyrothrix urocephalum.
Tyrothrix catenula.
Tyrothrix claviformis.

Groupe du *Streptocoque*.

Streptocoque.
Pneumocoque.
Entérocoque.

Groupe du *Gonocoque*.

Gonocoque et Pseudo-gonocoques.
Méningocoque et Pseudo-méningocoques.
Micrococcus catarrhalis.

Il paraît difficile de pousser plus loin les groupements. La plupart des espèces restent en dehors, c'est la grosse objection à mettre en avant.

L'établissement des coupes de degré supérieur est moins absolue encore que celui des espèces. La création d'un de ces groupes, genre ou famille, ne peut se faire avec quelque certitude qu'après connaissance de toutes les unités qui doivent le composer, ou au moins du plus grand nombre d'entre elles. Or, pour ces êtres, on est bien loin d'en être arrivé là ; il reste certainement plus d'espèces inconnues qu'il en existe de suffisamment bien décrites.

Cohn (1), en 1882, a donné un premier essai de classification des Bactéries, basé exclusivement sur la forme apparente. Il en formait quatre tribus :

Les *Sphérobactéries*, ou Bactéries sphériques, ne renfermant que le genre *Micrococcus* ;

Les *Microbactéries*, ou Bactéries en courts bâtonnets, comprenant le genre *Bacterium* ;

Les *Desmobactéries*, ou Bactéries filamenteuses, avec les genres *Bacillus* et *Vibrio* ;

Les *Spirobactéries*, ou Bactéries spiralées, avec les deux genres *Spirillum* et *Spirochæte*.

(1) Cohn, Untersuchungen über Bacterien (*Beitr. zür Biol. der Pflanzen.* 1re et 2e parties, p. 127, 1882).

Plus tard, ce même savant (1), frappé des affinités que certaines Bactéries présentent avec des Algues de la famille des *Oscillariées* principalement, les réunit dans sa classe des *Schizophytes*, rangeant dans un même système très compliqué des êtres qui étaient évidemment bien distincts.

Ce n'était qu'un premier pas vers une classification rationnelle. Le grand tort en était de séparer par trop des formes voisines comme les *Bacterium* et *Bacillus*, *Vibrio* et *Spirillum*. Zopf (2) a imaginé un classement en familles, qui tient compte en partie des considérations précédentes, tout en faisant trop grand cas de certains caractères peu précis. C'est la forme qui tient encore le premier rang ; vient ensuite la présence ou l'absence des spores, ne pouvant fournir une base bien solide à cause du peu de données certaines que l'on possède ; enfin, comme distinction très importante, il donne ces prétendues variations de formes, sur l'appréciation desquelles on est bien loin de s'entendre. Il range les Bactéries dans les quatre familles suivantes :

1° Coccacées. Ne possédant que des coccus isolés ou réunis en chaînes. — Pas de spores connues. La division se fait suivant une ou plusieurs directions.

Genres : *Streptococcus*, *Micrococcus*, *Merismopedia*, *Sarcina*, *Ascococcus*.

2° Bactériacées. Possèdent des coccus, des bâtonnets droits ou courbés. On ne peut distinguer aux filaments ni partie basilaire, ni sommet. La division se fait suivant une seule direction. On connaît des spores chez beaucoup.

Genres : *Bacterium*, *Spirillum*, *Vibrio*, *Leuconostoc*, *Bacillus*, *Clostridium*.

3° Leptothricées. Des coccus, des bâtonnets et des filaments droits ou courbés, auxquels on trouve une différenciation en partie basilaire et sommet. Les spores sont peu connues.

Genres : *Leptothrix*, *Beggiatoa*, *Crenothrix*, *Phragmidiothrix*.

4° Cladothricées. Des coccus, des bâtonnets, des filaments et des formes spiralées. Les filaments sont unis en fausses ramifications. Les spores sont peu connues.

Genre : *Cladothrix*.

Bien des objections sont à faire à ce système qui, toutefois, satisfait plus l'esprit que les divers essais de Cohn. Nous avons discuté précédemment la valeur de ces variations de formes, servant ici de caractère important ; nous n'y reviendrons pas.

Des cinq genres de la famille des Coccacées, les trois premiers ne peuvent guère être regardés comme bien distincts à cause de la grande variabilité et de l'inconstance de la disposition des éléments. Le genre *Leuconostoc*, que Zopf range dans la famille des Bactériacées, présente beaucoup plus d'affinités avec les genres de la famille des Coccacées.

La famille des Bactériacées est plus homogène. Le nombre des

(1) Cohn, Untersuchungen über Bacterien (*Beitr. zür Biol. der Pflanzen*, 3e partie, p. 202).
(2) Zopf, Die Spaltpilze, p. 50.

genres doit cependant en être réduit. Il n'est pas possible de séparer un genre *Bacterium* du genre *Bacillus* ; les seuls caractères de longueur, sur lesquels il est établi, ont une valeur trop secondaire et ne présentent du reste aucune constance. Le genre *Vibrio* se confond avec le genre *Spirillum*. Enfin, le genre *Clostridium*, créé par Prazmowski pour le *Bacillus butyricus*, caractérisé par le renflement des articles à l'endroit où se produit la spore, ne peut guère être maintenu, vu le peu de constance qu'offre cette particularité. Beaucoup de véritables *Bacillus*, en effet, montrent tous les intermédiaires entre le bâtonnet sporifère de forme ordinaire et le même article renflé à l'endroit de la spore. Avant d'avoir des notions plus complètes sur un nombre suffisant d'espèces, il paraît téméraire de subdiviser un groupe aussi homogène que paraît l'être le genre *Bacillus*.

C'est surtout la troisième famille, celle des Leptothricées, qui est mal composée. A côté des *Leptothrix*, qu'aucun caractère ne sépare des Bactériacées, se trouvent placés des organismes absolument différents des autres Bactéries. Les *Beggiatoa* et *Crenothrix* doivent être rapprochées des Algues et classées près des Oscillariées dont elles ne diffèrent que par l'absence de chlorophylle et du pigment spécial, la phycocyanine.

Le *Cladothrix dichotoma*, tel qu'il est compris par Zopf, est une forme qui fait partie du cycle évolutif d'Algues blanches ; il doit disparaître comme type spécial. J'ai repris le nom générique, dès 1888, pour l'appliquer à d'autres formes microbiennes, placées par Cohn dans son voisinage, présentant une ramification vraie des filaments, formes qui ont aussi reçu d'autres dénominations, en particulier celle de *Streptothrix*, antérieurement attribuée à des Champignons filamenteux, et celle d'*Oospora*, déjà appliquée aussi à des Mucédinées bien différentes. Gasperini a, postérieurement toutefois, proposé le nom d'*Actinomyces* qui peut aussi être très bien accepté.

Les *Cladothrix*, comme elles sont comprises ici, paraissent très voisines des *Leptothrix* ; la disposition ramifiée des filaments, toute secondaire, ne suffit pas à légitimer une semblable distinction. Parmi les *Cladothrix* doivent se placer les *Actinomyces*.

En somme, dans le groupe des Bactéries, deux grandes coupes paraissent s'imposer, qu'on peut considérer comme des familles : celle des Coccacées renfermant les espèces à éléments arrondis et celle des Bactériacées contenant celles à éléments allongés.

Dans la première, le genre *Micrococcus* paraît assez net ; il est difficile, à cause des passages, de séparer, comme genres, les *Streptocoques* et les *Diplocoques*. Le genre *Sarcina*, qu'on peut maintenir, a même une transition par les *Tétragènes* ; il n'est pas possible d'en séparer, comme le fait Migula (1), un genre *Planosarcina* fondé sur la seule mobilité. Les genres *Ascococcus* et *Leuconostoc* sont moins sûrs.

Dans la seconde famille, il est difficile jusqu'alors de démembrer le genre *Bacillus*. On peut en séparer les espèces qui seront étudiées sous le nom d'*Ascobacterium*. Il ne semble pas qu'il y ait à maintenir quelqu'une des divisions, poussées véritablement à l'excès, proposées par Toni et Trevisan (2), basées toutes sur des caractères de très minime valeur. Même pour leur genre *Pasteurella*, qui passe dans la pratique

(1) Migula, System der Bakterien, I, 1897 ; II, 1900.
(2) Toni et Trevisan, Sylloge Schizomycetum, 1889.

courante, le caractère séparatif, contenu protoplasmique formant deux amas aux pôles des éléments, ne peut pas être regardé comme ayant une valeur suffisante, parce qu'on le rencontre chez bien d'autres espèces en bâtonnets. Il faut cependant reconnaître qu'au point de vue physiologique le groupe paraît assez net ; les Bactéries que l'on y place occasionnent des affections similaires, les *septicémies hémorragiques ou pasteurelloses*. Ce sont des désignations utiles à garder, comme nous en avons déjà signalées, mais ne pouvant pas être considérées comme devant être des caractères de valeur générique. Il en est aussi de même pour le genre *Corynebacterium* de Lehmann et Neumann, établi pour les bâtonnets présentant des renflements en massue terminaux, comme le *Bacille de la diphtérie* ; et pour le genre *Mycobacterium*, créé par les mêmes pour des espèces en bâtonnets pouvant présenter des ramifications, comme le *Bacille de la tuberculose* ; pour le genre *Pseudomonas* de Migula, pour les bâtonnnets à cils polaires. Ce sont des particularités dont la valeur est encore trop peu connue et dont la production paraît souvent sous la dépendance de conditions de vie trop spéciales, pour qu'on puisse être assuré qu'elles font partie du cycle évolutif normal et en faire des caractères génériques.

Au point de vue purement descriptif, il paraît encore difficile de distinguer du genre *Spirillum* un genre *Vibrio* et un genre *Spirochæte* ; les passages entre ces formes, les transitions, sont trop nombreux et trop inconstants.

En se basant sur les raisons exposées, il semble plus rationnel de diviser le groupe des Bactéries en deux familles de la façon suivante :

1re famille : Coccacées. — Bactéries à éléments normalement sphériques se reproduisant d'habitude par division, quelquefois par spores. La division peut se faire suivant une ou plusieurs directions.

Genres : 1. *Micrococcus*, éléments sphériques, isolés, réunis par deux ou plus, disposés en chapelets.

2. *Sarcina*, éléments formant des paquets cubiques provenant de la division qui se fait en trois directions.

3. *Ascococcus*, éléments réunis en colonies massives, entourées d'épaisses enveloppes de gelée.

4. *Leuconostoc*, éléments disposés en chaînes, enveloppées d'une gaine de gelée.

2e famille : Bactériacées. — Éléments en bâtonnets plus ou moins longs, parfois en très courts cylindres, ou en filaments. Les articles sont droits ou courbés et ne présentent aucune distinction en partie basilaire et sommet. Beaucoup ont de vraies spores endogènes.

Genres : 1. *Bacillus*, éléments en bâtonnets qui peuvent être courts et trapus ou dont la longueur excède un certain nombre de fois l'épaisseur.

2. *Spirillum*, éléments courbés, formant souvent une spire à plusieurs tours.

3. *Leptothrix*, éléments formant des filaments droits, parfois très longs, non ramifiés.

4. *Cladothrix*, longs filaments présentant des ramifications latérales.

La classification qui vient d'être exposée est loin de devoir être considérée comme définitive. Elle a surtout pour objet d'exprimer les rapports que l'on sait aujourd'hui exister entre les formes suffisamment décrites, et d'en faciliter la description et la recherche. Sous ce dernier rapport, un groupement tant soit peu rationnel est d'une utilité incontestable. Ce n'est, en effet, qu'en établissant des points de repère plus sûrs et en se conformant, dans les descriptions, aux règles admises pour toutes les classifications, qu'il sera possible de mettre un peu d'ordre dans la liste, déjà bien longue, des espèces connues actuellement. Beaucoup de bons travaux, en particulier, ne donnent pas les résultats que l'on était en droit d'en attendre, par cette raison que leurs auteurs n'ont malheureusement pas assez cherché à caractériser les espèces qui ont fait le sujet de leurs recherches, ce qui ne permet pas de les reconnaître facilement. Il est légitime de penser que toutes les classifications proposées jusqu'ici doivent être considérées comme provisoires.

1re FAMILLE. — COCCACÉES.

Les cellules des Bactéries qui constituent cette première famille sont normalement sphériques ou légèrement ovoïdes, parfois asymétriques, l'un des côtés étant aplati. On n'observe de formes allongées que dans des conditions tout à fait anormales ; ce sont de véritables formes d'involution. La formation de spores n'est connue que chez quelques espèces. Chez le *Leuconostoc mesenteroides*, certains éléments des chaînes de coccus grandissent, prennent une paroi épaisse et un contenu réfringent, caractères habituels des spores ; ce sont des spores d'un type spécial, des *arthrospores*, issues de la transformation totale de l'élément mère. Des *endospores* ont été décrites chez quelques autres espèces. Hauser (1) en a observé chez une *Sarcine*, présentant bien nettement la double coloration propre aux spores d'autres Bactéries et supportant sans périr une température de 100°. Prove (2) signale chez le *Micrococcus ochroleucus* la formation de spores, qui, à la maturité, ont un diamètre double de celui de l'élément mère. Sauf les trois cas cités, la formation d'éléments reproducteurs résistants et durables n'est connue dans aucune autre espèce. Le procédé habituel de multiplication est la division, qui peut se faire tantôt dans une seule direction, tantôt dans plusieurs (Voy. p. 70). Dans le premier cas, les éléments issus de la division peuvent se séparer, ou rester unis à deux ou plusieurs ; ils forment, selon leur disposition, des amas irréguliers, des couples ou des chapelets. Si la division se fait suivant deux plans perpendiculaires, un élément se partageant crucialement en donne quatre ; on obtient alors une petite tablette qui peut être composée d'un grand nombre d'éléments, lorsque le phénomène s'est répété un certain nombre de fois. Enfin, une cellule mère peut se diviser successivement, suivant trois plans perpendiculaires, et donne ainsi huit cellules filles qui restent unies et se multiplient à leur tour de la même façon ; c'est ainsi que se forment les amas cubiques de *Sarcines*, composés souvent d'un nombre considérable d'éléments.

(1) Hauser, Ueber Lungensarcine (*Deutsche Arch. für klin. Med.*, XLII, 1887, p. 127).
(2) Prove, Micrococcus ochroleucus, eine neue chromogene Spaltpilze (*Beitr. zur Biol. der Pflanzen*, 1887, 4e vol., 3e p., p. 409).

La famille des Coccacées comprend quatre genres, caractérisés de la façon suivante :

1er genre : *Micrococcus*. — Cellules rondes ou ovoïdes, isolées ou réunies par deux, en chapelets d'un nombre variable d'éléments ou en tétrades. La division s'opère suivant une ou deux directions.

2e genre : *Sarcina*. — Cellules sphériques ou ovoïdes, chez lesquelles la division s'opère dans trois directions et donne alors des masses cubiques plus ou moins volumineuses.

3e genre : *Leuconostoc*. — Cellules rondes, réunies en chapelets entourés d'une épaisse gaine de gelée : il se forme des arthrospores.

4e genre : *Ascococcus*. — Cellules rondes, réunies en familles ovoïdes et irrégulières, enfermées dans une enveloppe épaisse de substance gélatineuse de consistance de cartilage.

1er genre : MICROCOCCUS Cohn.

Le nom générique est de Hallier, qui comprenait sous cette dénomination, à côté des Bactéries sphériques, un grand nombre de formes bien différentes. C'est Cohn qui a fixé ses caractères et lui a assigné les larges limites qu'on peut encore lui reconnaître aujourd'hui. Les espèces qui le composent ont les cellules sphériques ou légèrement elliptiques, peut-être ovoïdes, de forme parfaitement régulière ou un peu irrégulière; un élément prêt à se diviser peut même avoir la forme d'une ellipse allongée ou d'un court bâtonnet à extrémités arrondies. Les cellules issues de la division se comportent de diverses façons. Elles peuvent se séparer aussitôt, elles forment alors des amas dont les éléments n'ont entre eux aucune cohérence. Bien qu'en se séparant dès que la scission est complète, elles peuvent rester accolées les unes aux autres en nombre variable, donnant des figures irrégulières qui ont été comparées, d'une façon assez peu heureuse, à des grappes de raisin et dénommées pour cette raison *Staphylococcus* (σταφυλή, grappe). Ces cellules filles restent souvent unies deux par deux : chez beaucoup d'espèces qui présentent cette disposition, les éléments isolés sont rares ; on n'y observe généralement que des couples, formés de deux coccus accolés, se comportant en tout point comme s'ils ne constituaient qu'un seul individu ; il faut parfois une grande attention et de puissants objectifs pour se rendre compte de la présence de deux éléments. Cette dernière forme a été appelée *Diplococcus* (διπλόος, double). Lorsque deux couples s'accolent latéralement, il se forme une tétrade. Les éléments peuvent rester unis en files plus ou moins longues, et former des chapelets dont la grandeur varie suivant le nombre des articles qui les constituent ; on a donné à cette disposition le nom de *Streptococcus* (στρεπτὸς, sinueux). On a voulu faire de ces particularités de véritables caractères génériques, en leur attribuant une importance qu'ils ne semblent pas avoir, et s'en servir pour établir des coupes dans le genre *Micrococcus* tel que nous le comprenons ici. Les rapports qu'affectent les éléments les uns avec les autres sont trop souvent sujets à des variations, dont

les causes nous échappent encore totalement jusqu'ici, pour qu'on puisse raisonnablement les placer en première ligne. Les conditions de milieu influent considérablement sur elles; telle espèce qui, cultivée sur un milieu solide, donnera des chaînettes ou des diplococcus, transportée dans un milieu liquide, n'y montrera que des éléments isolés. Du reste, une même espèce peut offrir côte à côte ces trois formes dans une même culture, ce qui prouve bien le rôle secondaire de la disposition des éléments pour la classification. Enfin, les mêmes faits se retrouvent absolument chez les Bactéries en bâtonnets sans qu'on ait jugé bon de se conformer aux indications qu'ils semblent fournir. La valeur de ces formes est cependant réelle et peut être d'un grand secours dans la diagnose et dans la différenciation, souvent si difficile, d'espèces se ressemblant par leurs caractères de cultures. Les dénominations sont donc à conserver, mais sans attribution de valeur générique.

Prove (1) a décrit la formation de spores chez le *Micrococcus ochroleucus*, espèce qu'il a isolée de l'urine. Jusqu'alors elles n'étaient connues chez aucune espèce de *Micrococcus*. Il est probable que les perfectionnements de la technique permettront d'en observer la production chez d'autres.

Citons enfin, comme caractère moins important et moins intéressant à connaître, le peu de tendance des *Micrococcus* à former des voiles à la surface des liquides. Ils se précipitent d'habitude au fond du vase en un sédiment plus ou moins consistant, blanc ou coloré. De plus, les espèces mobiles ne présentent presque jamais le mouvement vif et rapide qu'offrent certaines Bactéries en bâtonnets; le mouvement des *Micrococcus* est presque toujours une trépidation, qui n'occasionne d'habitude qu'un déplacement peu considérable.

Pour plus de commodité dans la description des nombreuses espèces de *Micrococcus*, et uniquement pour faciliter les recherches, nous les grouperons, à l'exemple de Cohn, d'après leur action physiologique.

Nous étudierons, dans un premier groupe, les espèces rencontrées dans les maladies de l'homme et des animaux, en réunissant aux espèces véritablement pathogènes d'autres qui ne paraissent avoir aucune action nuisible sur l'organisme malade ou même normal, mais qui ne se rencontrent pas en dehors de lui. Telles sont, par exemple, certaines espèces isolées du pus. Plusieurs espèces, en effet, qui, se trouvant dans l'organisme, semblent n'exercer sur lui aucune action nuisible, peuvent très probablement, par leur pullulation excessive, dans des conditions qui leur sont défavorables, devenir de véritables parasites, gênants ou même offensifs. Les *Micrococcus* qui produisent des pigments sont plus intéressants à étudier ensemble. Dans un troisième groupe, nous comprendrons les espèces qui occasionnent des fermentations et d'autres dont l'action physiologique est encore inconnue.

Nous grouperons donc les espèces du genre *Micrococcus* sous les rubriques suivantes, auxquelles, répétons-le, nous n'attribuons aucune valeur dans la classification : 1° Micrococcus pathogènes; 2° Micrococcus chromogènes; 3° Micrococcus ferments ou à action indifférente.

(1) Prove, Micrococcus ochroleucus, eine neue chromogene Spaltpilze (*Beitr. zur Biol. der Pflanzen*, 1887, 4e vol., 3e p., p. 409).

MICROCOCCUS PATHOGÈNES.

ESPÈCES OCCASIONNANT LA SUPPURATION.

La suppuration a été considérée pendant longtemps comme une suite ou une conséquence de l'inflammation des tissus, aboutissant à la nécrose et à l'élimination des parties enflammées.

C'est Pasteur (1) qui a annoncé le premier, en 1881, que la production du pus pouvait être la conséquence directe de la vie dans les tissus de Bactéries capables d'être multipliées en dehors de l'organisme par des procédés de culture artificiels et reproduisant des altérations semblables lorsqu'on les fait pénétrer par inoculation dans les tissus vivants. En cultivant, dans du bouillon, du pus de furoncles et d'ostéomyélite, il obtint le développement de Microcoques ronds, qui, inoculés aux lapins, reproduisaient chez ces animaux des phénomènes locaux de suppuration.

Peu après, Ogston (2), Rosenbach (3) et Passet (4) isolaient du pus plusieurs espèces de Bactéries, que les caractères des cultures permettaient de distinguer facilement.

Des recherches de ces observateurs et d'autres, nombreux, qui vinrent confirmer les résultats qu'ils avaient annoncés, il parut ressortir bien nettement que la suppuration était toujours sous la dépendance directe des microbes. C'est ce que vinrent confirmer encore des expériences d'injection, dans les tissus, de substances irritantes, privées de tout germe par une stérilisation soignée ; en première ligne, on doit citer celles de Straus. En introduisant sous la peau de lapins, de rats, de cobayes, des substances irritantes, très diverses, soigneusement stérilisées, ce savant n'observait jamais de suppuration, sauf dans quelques cas où il s'était produit une infection accidentelle, car le pus contenait les Bactéries ordinaires de la suppuration. Straus expérimenta avec l'essence de térébenthine, l'huile de croton, l'eau chaude, le mercure, des morceaux de drap ou de moelle de sureau. Toutes les précautions antiseptiques furent prises pour faire pénétrer la substance dans la peau. Ces résultats furent une confirmation de l'opinion, alors en cours, qu'il ne pouvait y avoir production de pus sans microbes.

Depuis, des recherches nouvelles ont donné des résultats quelque peu contradictoires, qui doivent faire admettre sur ce point une opinion moins exclusive et prouvent que, dans des conditions particulières, certaines substances, certains composés chimiques, peuvent produire dans un tissu une inflammation suivie de suppuration vraie, sans qu'on puisse faire intervenir une action microbienne.

Councilmann (5) le prouve en introduisant sous la peau de lapins de

(1) Pasteur, De l'extension de la théorie des germes à l'étiologie de quelques maladies communes (*C. R. de l'Acad. des sc.*, t. CX, 1880, p. 1033).

(2) Ogston, Report upon Microorganismen in surgical Disease (*The British med. Journ.*, 12 mars 1881).

(3) Rosenbach, Mikroorganismen bei den Wundinfections Krankheiten der Menschen. Wiesbaden, 1884.

(4) Passet, Untersuchungen über die Aetiologie der eitrigen Phlegmone des Menschen. Berlin, 1885.

(5) Councilmann, Zur Aetiologie der Eiterung (*Virchow's Archiv*, 1883).

petites ampoules de verre très fragiles, remplies d'huile de croton. L'opération est faite avec toutes les précautions antiseptiques possibles; la plaie guérit facilement; le mince corps étranger n'exerce aucune réaction sur les tissus. Après guérison parfaite, l'ampoule est brisée par un choc; le liquide se répand et vient au contact des tissus. Il se forme, à ces endroits, de petits abcès dont le pus, soigneusement examiné, ne montre jamais de Bactéries et reste stérile en cultures.

Grawitz (1) est arrivé à la même conclusion en injectant dans les tissus des substances liquides. Les solutions de sublimé corrosif, des acides ou des alcalis étendus, l'alcool fort ou absolu, n'ont déterminé aucune suppuration. Le nitrate d'argent, l'essence de térébenthine ont occasionné la formation d'abcès dans le tissu cellulaire du chien; une solution de cadavérine a produit également de la suppuration. Dans tous ces cas positifs, le pus ne contenait jamais de microbes.

Christmas(2) a obtenu des résultats positifs semblables, mais toutefois plus restreints. Dans ses expériences, faites à l'Institut Pasteur, l'essence de térébenthine, le mercure, le pétrole, le chlorure de zinc à 10 p. 100, le nitrate d'argent à 5 p. 100, n'ont rien produit, inoculés sous la peau de lapins. Une seule fois l'essence de térébenthine produisit de la suppuration, mais le pus était plein de Micrococques, ce qui prouvait qu'il y avait eu une contamination accidentelle pendant les opérations. En inoculant les mêmes substances dans la chambre antérieure de l'œil du lapin, même résultat négatif, sauf pour le mercure. Cinq centigrammes de mercure stérilisé à 160°, introduits dans la chambre antérieure de l'œil, donnent rapidement lieu à une formation de pus en quantité notable. Les cultures et la recherche microscopique, avant et après coloration, ne décèlent aucune Bactérie.

Chez le chien, le même expérimentateur est arrivé à des résultats bien différents, sans doute en raison de la facilité avec laquelle le tissu conjonctif sous-cutané s'enflamme et suppure chez cet animal. Le nitrate d'argent, l'essence de térébenthine, le mercure, ont donné lieu à une suppuration abondante et dans quelques cas ont produit de véritables abcès aigus, en tout comparables à ceux qu'occasionnent les microbes habituels du pus.

Enfin, des cultures de l'une des Bactéries les plus communes du pus, le *Micrococcus pyogenes aureus*, stérilisées à 100°, ont rapidement causé chez les chiens des abcès sous-cutanés. Ces cultures ne renfermaient aucun microbe revivifiable et le pus formé n'en contenait pas plus. L'effet produit ici est donc dû à une substance sécrétée par le microbe. Ces propriétés pyogènes sont détruites par le chauffage à 120° dans l'autoclave.

Chritsmas a pu isoler la substance pyogène, en précipitant par l'alcool des bouillons filtrés sur bougie Chamberland. Il se produit un précipité floconneux, qui, lavé à l'alcool puis redissous dans l'eau, produit une très minime suppuration par inoculation dans la chambre antérieure de l'œil du lapin. Grawitz, on l'a vu plus haut, avait déjà obtenu chez le chien de la suppuration sans microbes en injectant sous la peau des solutions de cadavérine.

(1) Grawitz, *Virchow's Archiv*, t. CVIII et CX, 1887.

(2) Christmas, Recherches sur la suppuration (*Ann. de l'Inst. Pasteur*, II, 1888, p. 469).

Depuis, on a retrouvé, dans les cultures de plusieurs espèces de Bactéries, de ces substances pyogènes appartenant aux groupes des toxalbumines ou des ptomaïnes. Büchner (1) en a signalé chez des espèces très diverses, entre autres le *Pneumocoque de Friedlaender*, le *Bacille du charbon*, le *Bacille de la morve*. Koch (2) en a découvert une dans les produits de culture du *Bacille de la tuberculose*.

Il semble, d'après cela, qu'on doive considérer la suppuration comme le simple effet d'une réaction des tissus contre certaines substances, composés chimiques ou produits sécrétés par des êtres vivants. Et ces êtres vivants peuvent ne pas être que des Bactéries ; d'après Kartulis (3), la suppuration du foie dans la dysenterie serait occasionnée par les Amibes qu'il considère comme l'agent spécifique de l'affection et qui se rencontrent en très grande abondance dans l'intestin. On connaît des Mucédinées pyogènes et des Levures pyogènes (4). Des Protozoaires, des Coccidies, des Myxosporidies peuvent aussi déterminer la suppuration. Quoi qu'il en soit, dans la pratique habituelle, on ne rencontre que des suppurations produites par des microbes ; la production du pus est toujours liée à la pénétration dans l'organisme de microbes pyogènes. Même dans ce cas, cependant, le pus peut être amicrobien ou plutôt stérile, la suppuration pouvant être la conséquence de produits qui imprègnent les restes de microbes détruits pour une raison ou pour une autre (5). Les expériences pour ou contre le pus sans microbes sont également vraies ; elles résultent de la différence dans les animaux d'expérience choisis, car les propriétés chimiotactiques des leucocytes varient avec les espèces, et le mécanisme de la suppuration par les microbes n'est qu'un phénomène de chimiotaxie positive provoqué par leurs toxines ou d'autres substances irritantes ; les leucocytes sont attirés vers l'endroit en cause, il s'y forme un abcès.

La propriété pyogène, on vient déjà de le voir, est dévolue à un assez grand nombre d'espèces de Bactéries. Certaines, très communes dans le pus, sont considérées à juste titre comme étant les véritables agents de la suppuration. La plupart sont des *Micrococcus*, ce sont des *Micrococcus pyogenes aureus*, *M. pyogenes albus*, *M. pyogenes citreus*, *Micrococcus cereus albus*, *M. cereus flavus*, ces deux derniers n'occasionnant jamais la suppuration par eux-mêmes, mais accompagnant fréquemment les précédents, *Micrococcus pyogenes*, *Micrococcus pyogenes tenuis* ; une seule est un court Bacille, *Bacillus pyogenes fœtidus* (6). Le *Bacille typhique*, le *Colibacille* déterminent souvent des suppurations ; il en est de même du *Gonocoque*, du *Méningocoque*, du *Pneumocoque*, du *Bacille tuberculeux* et d'une série d'autres espèces.

Ces espèces paraissent très répandues dans la nature ; en dehors des êtres qu'elles attaquent, leur répartition est cependant peu connue. Pasteur

(1) Büchner, *Berl. klin. Wochenschr.*, 28 juillet 1890.

(2) Koch, Communications sur le traitement de la tuberculose, 1890 et 1891.

(3) Kartulis, Ueber tropische Leberabcesse und ihr Verhältniss zur Dysenterie (*Virchow's Archiv*, CXVIII, 1890, p. 97).

(4) Grasset, Champignon pyogène parasite de l'homme (*Arch. de méd. expér.*, 1893). — Auché et Le Dantec, Mucédinée pyogène (*Arch. de méd. expér.*, 1895). — Nesczadimenko, Zur Pathogenese der Blastomyceten (*Centralbl. für Bakt.*, XXV, 1899, p. 55).

(5) Roger et Bonnet, Suppuration amicrobienne (*Soc. méd. des hôpitaux*, 5 juillet 1895).

(6) Kareinski, Statistischer Beitrag zur Kenntniss der Eiterungserreger bei Menschen und Thieren (*Centralbl. für Bakt.*, VII, 1890, p. 113).

a isolé de l'eau de Seine un Microcoque pyogène, son *Vibrion pyogène*, qui n'a pas été retrouvé depuis. C'est un coccus ovalaire, disposé souvent en diplocoques, dont les cultures, injectées dans le sang, déterminent une pyémie typique rapidement mortelle. J'ai signalé dans une eau de puits la présence du *Micrococcus cereus albus* (1). Plus récemment, Ullmann (2) a signalé la présence du *Micrococcus pyogenes aureus* dans l'air, dans l'eau de rivière et de pluie, mais pas dans l'eau de source, dans la glace, dans la terre mais rarement, à la surface des murs. Depuis, on l'a retrouvé un peu partout, à la surface du corps en particulier; il en est de même du *Streptocoque pyogène.* Cette large répartition dicte d'emblée quelles grandes précautions il faut prendre lorsqu'on veut éviter l'infection par ces microbes.

Les Bactéries pyogènes peuvent évoluer simplement dans des foyers circonscrits, elles ne produisent alors qu'une action locale ; ou bien, du point primitif d'introduction, se répandre dans la circulation par voie sanguine ou lymphatique et produire des phénomènes graves d'infection, étudiés sous les désignations de *pyémie* ou de *septicémie.* Ces états morbides peuvent être de véritables intoxications dues à l'arrivée dans le sang de produits toxiques, ptomaïnes ou toxalbumines, résidus de l'activité vitale des Bactéries. Dans d'autres cas, l'action se concentre sur certains organes, loin du point de pénétration, où il se forme des foyers secondaires d'inflammation, des *abcès métastatiques.*

Ces agents infectieux parviennent dans l'organisme par des voies diverses. La plupart du temps c'est par une solution de continuité, quelque petite qu'elle soit; ce peut être une simple écorchure tout aussi bien qu'une plaie à grande surface; c'est, dans le cas d'infection puerpérale, la large plaie utérine, produite par la chute du placenta. La peau saine, ne présentant aucune solution de continuité, n'est même pas une barrière absolue opposée à l'invasion; les expériences de Garré (3), qui a pu déterminer sur son bras la formation d'un anthrax, en frottant simplement la peau de cette partie avec une culture pure d'ostéomyélite, le prouvent amplement. Les Bactéries pénètrent alors en premier lieu dans les canaux excréteurs des glandes cutanées et, de là, envahissent les couches profondes. Souvent l'effet est immédiat; dans les auto-inoculations de Garré, l'inflammation a atteint en quelques jours son summum d'intensité. Parfois, au contraire, les accidents déterminés par l'infection primitive sont nuls ou peu appréciables; les germes pathogènes sommeillent pour ainsi dire dans l'organisme jusqu'à ce que se produisent des modifications spéciales qui en provoquent la pullulation. C'est ainsi, d'après Verneuil (4), qu'une simple contusion, sans la moindre déchirure, même superficielle, provoquerait l'apparition d'une ostéomyélite dont les germes seraient depuis longtemps enfermés dans l'organisme en état de *microbisme latent.* Nous savons, par les recherches de Duclaux (5), que les Bactéries, lorsqu'on écarte les conditions de végétation qui les affaiblissent, lorsqu'on les conserve

(1) Macé, *Ann. d'hyg.*, 1888.

(2) Ullmann, Die Fundorte der Staphylokokken (*Zeitschr. für Hygiene*, IV, 1888).

(3) Garré, Zur Aetiologie acut. eitriger Entzundungen (*Fortsch. der Med.*, 1885, n° 6). — Socin, Pathogénie de la suppuration (*Congrès franç. de chir.*, 1885).

(4) Verneuil, Du parasitisme microbique latent (*Bull. de l'Acad. de méd.*, 1886).

(5) Duclaux, Chimie biologique.

par exemple dans un milieu nutritif épuisé en ne laissant à leur disposition qu'une proportion très faible d'oxygène, conservent pendant un temps très long leur puissance végétative et leur virulence. Or, la même protection peut leur être donnée dans l'organisme, où elles conservent alors longtemps leurs propriétés pathogènes, qui peuvent se manifester dès que se produisent des circonstances favorables au développement.

MICROCOCCUS PYOGENES AUREUS Rosenbach.

(*Staphylococcus pyogenes aureus* ; *Staphylocoque doré*.)

Atlas de microbiologie, pl. viii.

Ce microbe a été isolé et cultivé la première fois par Pasteur (1) qui, en 1878, l'a isolé de l'eau de Seine et du pus de furoncle et d'ostéomyélite sous le nom de *Vibrion pyogénique*. Il a été bien décrit par Ogston (2), en 1881, qui lui a attribué le nom de *Staphylocoque*, et surtout par Rosenbach (3) en 1884. Il a fait depuis l'objet de bien des travaux.

C'est certainement l'espèce la plus fréquente dans le pus.

MORPHOLOGIE

Caractères microscopiques. — Ce sont des coccus sphériques,

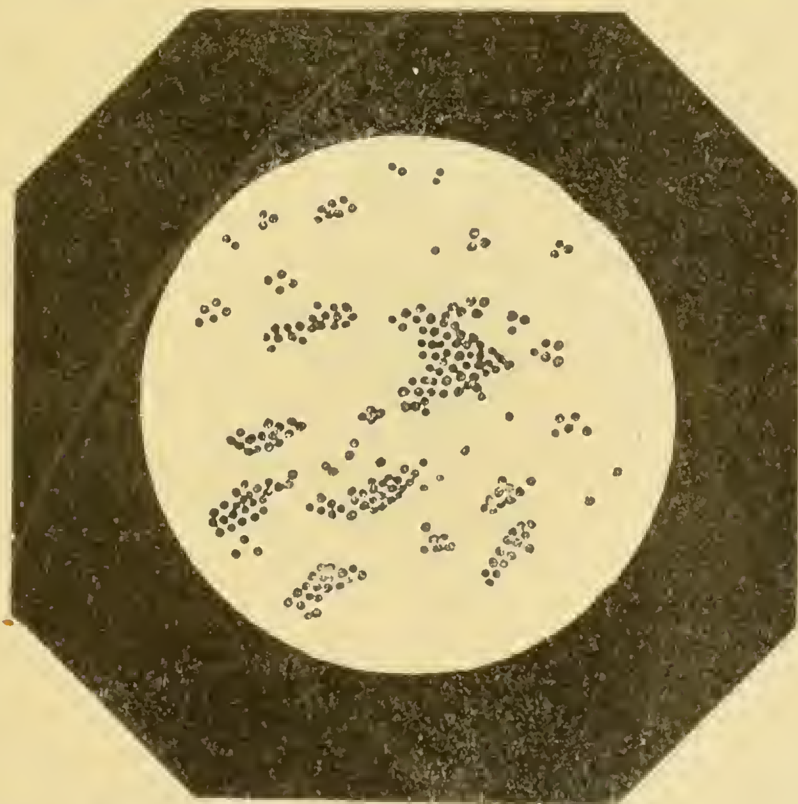


Fig. 189. — *Micrococcus pyogenes aureus*, d'une culture sur gélose.

mesurant de 0,6 μ à 1,2 μ de diamètre, isolés, parfois en diplocoques, disposés par quatre ou rarement en courtes chaînes irrégulières, à trois ou

(1) Pasteur, Le microbe du furoncle et de l'ostéomyélite trouvé dans l'eau (*C. R. de l'Acad. des sc.*, t. LXXXIX, 1878, p. 1033).

(2) Ogston, *loc. cit.*, p. 437.

(3) Rosenbach, *loc. cit.*, p. 437.

quatre articles au plus, toujours immobiles; le plus souvent, ils se groupent en amas irréguliers, qui ont été comparés à des grappes de raisin à cause de l'accolement régulier des grains, d'où le nom de *Staphylococcus* proposé comme désignation générique (p. 435) et la dénomination très usitée de *Staphylocoque*. La figure 189 représente les dispositions qu'affectent habituellement les éléments groupés ensemble. Les amas sont souvent constitués par un nombre plus ou moins grand de coccus, comme l'indique la figure 190 qui reproduit l'apparence habituelle du pus à Staphylocoques. Quelques microbes sont parfois contenus dans l'intérieur des globules du pus.

Fig. 190. — *Micrococcus pyogenes aureus*. Pus de panaris.

Coloration. — Le *Staphylocoque doré* se colore parfaitement avec les couleurs d'aniline et *ne se décolore pas* par la méthode de Gram.

Cultures. — Les cultures s'obtiennent facilement sur les milieux habituels.

Cultures en bouillon. — Ensemencée dans du bouillon, cette espèce le trouble très rapidement à 30°; il se forme au fond du ballon un dépôt peu abondant, d'abord blanc, puis jaunâtre. Le liquide reste toujours trouble.

Les cultures sur milieux solides sont autrement caractéristiques.

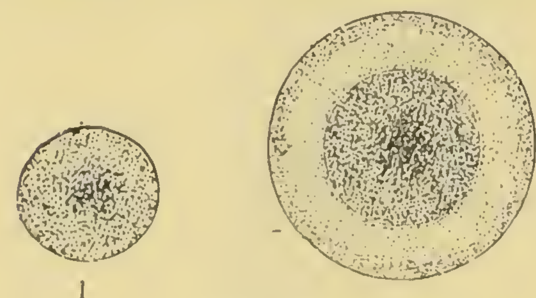


Fig. 191. — *Micrococcus pyogenes aureus.*

Cultures sur plaques : 1, colonie de 48 heures ; 2, colonie de 5 jours.

Cultures sur gélatine. — Le *Micrococcus pyogenes aureus* liquéfie rapidement la gélatine.

1° *Culture sur plaques.* — En culture sur plaques, il donne, au bout de quarante-huit heures à une température de 18°-20°, de petites colonies rondes, grisâtres, qui apparaissent, à un faible grossissement, comme de petits disques d'un brun jaune clair à la lumière transmise et d'un beau jaune d'or brillant sur fond noir ; le contenu en est granuleux et les bords très nets (fig. 191, *1*). La colonie s'étend peu à peu et, après quatre ou cinq jours, elle est formée d'une partie centrale foncée, opaque, qui représente la colonie primitive, et d'une zone annulaire formée de gélatine liquéfiée trouble (fig. 191, *2*). La liquéfaction s'étend et produit bientôt dans la gélatine un large creux contenant un liquide trouble parfois légèrement jaunâtre. Les cultures sur plaques développent dès le second jour une odeur pénétrante rappelant celle du lait aigri.

2° *Culture en piqûre.* — En piqûre dans un tube de gélatine, le développement est plus rapide encore. Après vingt-quatre heures à 20°, une masse granuleuse jaunâtre remplit le canal de la piqûre dans sa plus grande longueur; on n'observe presque rien à la surface. En quarante-

huit heures, il s'est formé une cupule de liquéfaction très nette, pleine d'un liquide blanchâtre trouble; les petites colonies qui se sont formées dans le sillon de la piqûre ne progressent guère. Du troisième au cinquième jour, la cupule de liquéfaction grandit et atteint les bords du tube (fig. 192), le liquide est laiteux, d'un blanc jaune. Du sixième au septième jour, un centimètre environ de la gelée est liquéfié. La liquéfaction ne marche plus que très lentement et s'arrête souvent à une bonne distance du fond de la masse de gelée, probablement à cause du manque d'oxygène. La culture a l'aspect représenté figure 193. A la partie supérieure se trouve une couche liquide, très trouble, légèrement visqueuse, que peut surmonter parfois une pellicule irrégulière blanche ou jaunâtre, très visqueuse, s'étirant en longs fils lorsqu'on la touche avec l'aiguille de platine. Sur la gelée restée solide, se trouve un dépôt jaune-orange épais. Dans le reste du canal, on voit, comme au début, de petites colonies grisâtres et quelquefois de petits amas mûriformes de couleur jaune d'or. La liquéfaction peut cependant tarder à se produire.



Fig. 192. — Cultures de *Micrococcus pyogenes aureus*, sur gélatine, en piqûre profonde.



Fig. 193. — Cultures de *Micrococcus pyogenes aureus*, sur gélatine, en piqûre profonde.



Fig. 194. — *Micrococcus pyogenes aureus*. Culture sur gélatine après simple piqûre superficielle.

Si l'on se borne à toucher simplement la surface de la gélatine avec l'aiguille chargée de la substance à ensemencer, il se produit une forme de culture assez spéciale, représentée par la figure 194. On observe, au bout de quelques jours, un sac de liquéfaction toujours irrégulier et présentant un ou deux étranglements peu prononcés qui le rendent asymétrique. La gélatine liquéfiée est trouble, il existe à la pointe du sac une petite masse floconneuse d'un blanc jaunâtre.

Culture sur gélose. — Sur gélose en strie, il se forme d'abord le long de la ligne d'inoculation de petites colonies blanches qui confluent bientôt et forment une bande mince et lisse, se colorant en jaune-orange, rappelant assez bien un large trait de couleur à l'huile de cette nuance.

La culture continue à croître pendant longtemps. On obtient au bout de quelques semaines une épaisse culture d'apparence grumeleuse, d'un jaune orangé brillant, dont les bords ondulés peuvent être blan-

châtres. En vieillissant, la partie centrale devient mamelonnée ou est partagée par des sillons longitudinaux. L'épaisseur, du reste, varie beaucoup suivant la semence employée (Voy. fig. 168, p. 326).

Culture sur pomme de terre. — Sur pomme de terre, cette Bactérie donne une couche épaisse, jaune d'or ou jaune-orange.

Culture dans le lait. — Dans le lait, où il croît très bien, ce microbe produit de l'acide lactique qui coagule bientôt le liquide.

Culture sur sérum coagulé. — Il donne une culture assez épaisse, blanche au début, se colorant peu à peu en jaune orangé.

Culture sur artichaut. — Les cultures sont peu abondantes ; elles sont formées de petites colonies sèches, bien isolées, jaune ocracé ; le milieu ne verdit pas.

PROPRIÉTÉS BIOLOGIQUES

Vitalité. — C'est un anaérobie facultatif qui semble avoir son optimum de température vers 37°-38° ; il cesse de croître vers 44°. Dans les cultures, il est tué par une température de 58°-62° en dix minutes, en une minute et demie à 80° (Sternberg) ; protégé par de la matière albuminoïde, il résiste même quelques minutes à 100°. On doit le regarder comme assez résistant en général à l'action de la chaleur. Par contre, il pourrait encore végéter vers 6° à 8°.

L'action des antiseptiques sur ce microbe paraît être assez variable (1) (Voy. p. 85). Il serait tué en dix minutes par le sublimé à 1 p. 1000, ou, pour d'autres auteurs, seulement après trois à cinq heures ; en une heure par l'aldéhyde formique à 1 p. 100, en vingt-quatre heures à 1 p. 1000 ; en quinze à trente minutes par l'acide phénique à 1 p. 100 ; en deux minutes à 3 p. 100, presque instantanément à 5 p. 100. La lumière solaire directe diminue rapidement sa virulence (p. 10). Il résiste beaucoup à la dessiccation. En général, sa résistance aux causes de destruction paraît être assez grande.

Les cultures conservent très longtemps leur vitalité ; elles peuvent encore fertiliser de nouveaux milieux après plus d'un an d'existence : ces vieilles cultures, ensemencées à nouveau sur gélatine, la liquéfient beaucoup plus lentement, souvent seulement après un long temps, mais donnent cependant des ensemencements fertiles.

Dans des cadavres d'animaux, Klein l'a retrouvé vivant après quatre semaines, mais plus de six à huit.

Virulence. — Elle est d'habitude bien marquée chez un microbe obtenu récemment des lésions de l'homme ou d'animaux ; parfois cependant elle est faible. En culture dans les milieux habituels, elle se conserve en général assez longtemps ; parfois elle s'atténue assez vite. D'après Budjwid (2) et autres (3), la présence de glucose dans les milieux exalterait la virulence du microbe.

(1) Tarnier et Vignal, Recherches expérimentales sur l'action de quelques antiseptiques sur le Streptocoque et le Staphylocoque pyogènes (*Arch. de méd. expér.*, II, 1890, p. 469).

(2) Budjwid, Traubenzucker als Ursache der Eiterung neben Staphylococcus aureus (*Centralbl. für Bakt.*, IV, 1888, p. 577).

(3) Nicolas, Influence de la glucose sur le pouvoir pyogène et la virulence générale du *Staphylococcus pyogenes aureus* (*Arch. de méd. expér.*, 1896).

Produits formés dans les cultures. — *Odeur.* — Toutes les cultures développent une odeur aigre spéciale qui se perçoit au bout de très peu de temps. Dans les cultures jeunes, l'odeur est celle de la colle de farine fermentée; dans les vieilles, c'est celle du lait aigri.

Matière colorante. — La matière colorante jaune orangé ne se produit qu'à l'air, au mieux vers 20°; sous une couche d'huile, la culture progresse lentement, mais reste blanche. Après plusieurs générations, la coloration se fait moins vite et plus difficilement; souvent même le centre seul de la culture se colore, la périphérie reste blanche. Cette matière colorante donne bien nettement, à l'état sec, la réaction des lipochromes avec l'acide nitrique (p. 170); elle est insoluble dans l'eau, légèrement soluble dans l'alcool, l'éther, le chloroforme, l'acétone, le benzène.

Produits divers. — Il produit une notable quantité d'acides aux dépens des matières sucrées (1). En présence de lactose, il forme principalement de l'acide lactique et parfois de l'acide sébacique; la dextrose donne de l'acide lactique, de l'acide acétique et de l'acide valérianique. Avec la glycérine, on trouve de l'acide lactique, des acides isobutyrique, valérianique et propionique. Il sécrète des ferments pepsiques, comme le montrent la liquéfaction de la gélatine et la peptonisation du blanc d'œuf. Aux dépens des albuminoïdes, il formerait de l'ammoniaque.

Il donne rapidement une notable proportion d'hydrogène sulfuré. Dans les bouillons renfermant 1 p. 100 d'azotates alcalins, il forme des nitrites.

D'après Kitasato, il ne ferait pas d'indol; d'autres observateurs disent qu'on en rencontre un peu dans ses cultures âgées.

Produits toxiques. — Les cultures renferment des produits toxiques. En exposant des bouillons de culture âgés de vingt à vingt-cinq jours à une température de 55° pendant vingt-quatre heures, tous les microbes sont tués, comme on peut s'en assurer par l'ensemencement; le liquide est modérément toxique pour le chien et le lapin. La filtration sur bougie donne le même résultat, mais la toxicité du liquide est encore moindre, parce que la bougie retient une forte proportion de substance active.

Brieger (2) a isolé, de culture sur bouillie de viande de cette espèce, de petites quantités d'une base organique, qui ne lui a montré aucun effet toxique. Le chlorhydrate de cette ptomaïne cristallise en aiguilles incolores non altérables à l'air.

Leber (3) a retiré de cultures une substance cristallisable, soluble dans l'alcool, déterminant rapidement, lorsqu'on l'injecte en faible quantité dans les tissus, une inflammation suppurative aboutissant à la nécrose. Il l'a nommée *phoglosine*. Elle est bien distincte de celle obtenue par Brieger; elle ne contient pas d'azote. Nous avons vu que Christmas (4) avait rencontré dans ses cultures une substance soluble dans l'eau, précipitable par l'alcool, se détruisant à 120°, ressemblant aux diastases; elle détermine une légère suppuration, inoculée dans la chambre antérieure de l'œil du lapin (p. 138).

(1) Achard et Gaillard, Contribution à l'étude biochimique des genres Tétragène et Staphylocoque (*Arch. de méd. expér.*, XI, 1899, p. 96).
(2) Brieger, Microbes, ptomaïnes et maladies, traduct. Paris, 1888.
(3) Leber, Ueber die Enstehung des Entzündung (*Fortschr. der Med.*, 1888, n° 2).
(4) Christmas, Recherches sur la suppuration (*Ann. de l'Inst. Pasteur*, 1888).

D'après Rodet et Courmont (1), les bouillons de culture âgés d'une vingtaine de jours renferment plusieurs substances toxiques de propriétés différentes. Les unes sont précipitables par l'alcool et appartiennent probablement au groupe des toxalbumines : les autres, solubles dans l'alcool, représentent sans doute les produits obtenus par Brieger et Leber. Ce sont surtout les premières qui sont toxiques; cependant, d'après Courmont (2), l'alcool précipite une substance à action *vaccinante* manifeste. Ces produits toxiques sont remarquables par leurs effets respiratoires et tétaniques. Les substances solubles dans l'alcool, à effets anesthésiques marqués, bien que très toxiques également, seraient plutôt des *antagonistes* des précédentes ; elles produisent chez le chien l'abaissement de la température et la mort par arrêt du cœur. Nous avons déjà vu que Courmont avait reconnu, dans les produits solubles dans l'alcool, la présence d'une substance *prédisposante* à l'égard de l'infection par ce même microbe (p. 127).

Les expériences de Mosny et Marcano (3) démontrent que l'inoculation intraveineuse au lapin de bouillons de culture stérilisés par filtration, à la dose de 10 centimètres cubes, tue l'animal en quelques secondes; à dose faible, 1 ou 2 centimètres cubes, il y a survie, assez longue au moins. Ces animaux qui survivent ne sont jamais vaccinés ; bien au contraire, ils semblent plutôt prédisposés à l'infection par le Staphylocoque virulent. La plupart du temps, ils maigrissent, deviennent cachectiques et meurent en cinq ou six semaines, en présentant à l'autopsie de nombreux petits abcès des parois intestinales et une péritonite purulente. Dans le pus, on ne rencontre que les microbes habituels de l'intestin ; la toxine a donc provoqué le passage des microbes du contenu intestinal à travers les parois.

La *toxine staphylococcique* contiendrait une *leucocidine* à action énergique, d'après Van de Velde (4), Bail (5) et Lingelsheim (6). Neisser et Wechsberg (7) y signalent en outre une *hémolysine* (*staphylolysine*) ; en ajoutant une goutte de sang de lapin à une petite quantité de culture en bouillon, filtrée ou non, l'hémolyse est complète souvent après quelques heures, parfois seulement après plusieurs jours.

INOCULATION EXPÉRIMENTALE

Le *Staphylocoque pyogène doré* est pathogène pour la plupart des animaux; c'est le lapin qui paraît être le plus réceptif et, par conséquent, l'animal de choix pour l'expérimentation. Le cobaye se comporte à peu près comme le lapin, mais est moins sensible que lui. Le chien, la souris, le rat ont été inoculés avec succès.

(1) Rodet et Courmont, Étude expérimentale des substances solubles toxiques élaborées par le Staphylocoque pyogène (*Revue de méd.*, XIII, 1893, p. 84).

(2) Courmont, Étude sur les substances solubles prédisposant à l'action pathogène de leurs microbes producteurs (*Revue de méd.*, XI, p. 842).

(3) Mosny et Marcano, Toxine du Staphylocoque pyogène (*C. R. de l'Acad. des sc.*, CXIX, 1894, p. 962).

(4) Van de Velde, Étude sur le mécanisme de virulence du Staphylocoque pyogène (*La Cellule*, X, fasc. 2).

(5) Bail, Ueber leucocide Substanzen in der Stoffwechselprodukten von Staphylococcus pyogenes aureus (*Zeitschr. für Hygiene*, XXX).

(6) Lingelsheim, Aetiologie und Therapie der Staphylokokken-Infection. Berlin, 1900.

(7) Neisser et Wechsberg, Ueber das Staphylotoxin (*Zeitschr. für Hygiene*, XXXVI, 1901, p. 299).

Les cultures sont virulentes et conservent d'ordinaire longtemps leur pouvoir infectieux; d'autres fois, elles s'atténuent assez vite. Les inoculations faites sous la peau ne donnent la plupart du temps qu'une inflammation qui reste localisée. Il se forme, à l'endroit choisi, un abcès plus ou moins gros qui guérit facilement. Si même la quantité de matière introduite est faible, l'effet peut être très peu marqué. Garré, on s'en souvient, n'a déterminé que des accidents locaux en oignant son bras d'une forte quantité de produit de cultures fraîches. Parfois cependant l'infection se généralise et la mort s'ensuit avec les symptômes typiques de la pyémie. L'injection intrapéritonéale détermine une péritonite purulente rapidement mortelle. En inoculation intraveineuse, le parasite se répand par la voie sanguine dans tout l'organisme et produit son action nécrobiotique dans des endroits divers, en se localisant surtout à certaines places de prédilection. C'est ainsi qu'il s'amasse souvent dans les reins, en produisant une véritable néphrite septique. La septicémie ainsi produite tue le lapin en un laps de temps qui varie entre vingt-quatre et quarante-huit heures. D'après Rodet (1), injecté dans le sang, il montre une véritable préférence pour les os, et là agit spécialement sur les parties de plus rapide accroissement; il y détermine, chez le lapin, des lésions d'ostéite juxta-épiphysaire comparables à celles de la maladie humaine. Ce même expérimentateur est parvenu à produire une sorte d'ostéomyélite en combinant avec l'inoculation intraveineuse une lésion traumatique des os. Wyssokowitsch (2), Ribbert (3), Bonome (4) ont produit chez les lapins des endocardites, en leur injectant dans les veines des bouillons de cultures; les lésions siégeaient surtout au niveau des valvules, sur lesquelles s'observaient souvent des ulcérations ou des végétations très apparentes. Les localisations peuvent être nombreuses, l'état devient alors très grave.

IMMUNITÉ ET SÉROTHÉRAPIE

Rodet et Courmont (5) ont obtenu une immunité marquée par les produits vaccinants solubles dans l'alcool et par l'inoculation sous-cutanée répétée de cultures jeunes entières. Le sérum des animaux ainsi immunisés leur a paru atténuer la virulence du microbe. Viquerat (6) et Kosc (7) disent avoir obtenu un sérum préventif contre l'inoculation intraveineuse du Staphylocoque. Parascandolo (8) vaccine des animaux à l'aide de cultures très virulentes faites dans des bouillons sucrés; ces

(1) Rodet, Études expérimentales sur l'ostéomyélite infectieuse (*C. R. de l'Acad. des sc.*, XCVIII, 1884, p. 569).

(2) Wyssokowitsch, Ueber die Schicksale der in's Blut injectiren Microorganismen (*Zeitschr. für Hygiene*, I p., p. 3).

(3) Ribbert, Ueber experimentell erzeugte Endocarditis (*Berlin. klin. Wochenschr.* 1886, p. 450).

(4) Bonome, Contribution à l'étude des Staphylocoques pyogènes (*Arch. ital. de Biol.*, VIII, fasc. I, p. 10).

(5) Courmont, Des propriétés bactéricides ou microbiophiles du sérum de lapin (*Arch. de physiol.*, 1885).

(6) Viquerat, Das Staphylokokkenheilserum (*Zeitschr. für Hygiene*, XVIII, 1895).

(7) Kosc, Serum antistaphylococcium (*Centralbl. für Bakt.*, 1 Abth., XXVI, 1876, p. 648).

(8) Parascandolo, Expériences sérothérapeutiques contre les infections par les microbes pyogènes et contre l'érysipèle (*Arch. de méd. expér.*, mai 1896, p. 320).

cultures sont stérilisées par addition de 5 p. 100 d'acide phénique et injectées à doses progressivement croissantes. Le sérum de ces animaux neutralise, *in vitro*, les toxines et les microbes et est préventif et curatif à l'égard des infections à Staphylocoques. Le même expérimentateur a cultivé ensemble plusieurs espèces pyogènes et obtenu un sérum efficace contre des associations qui se rencontrent souvent dans les infections. Les *sérums antistaphylococciques* obtenus sont encore trop faibles pour être utilement employés en thérapeutique (1); certains paraissent cependant doués de propriétés bactéricides marquées à l'égard du microbe et d'une certaine action atténuante vis-à-vis de l'infection qu'il détermine (2).

Wright (3) dit obtenir de bons résultats dans le traitement des affections staphylococciques par l'emploi de vaccins préparés à l'aide de cultures atténuées.

HABITAT ET RÔLE ÉTIOLOGIQUE

On le trouve dans beaucoup de suppurations, en particulier dans le pus des furoncles, des anthrax, de l'ostéomyélite, de beaucoup de phlegmons, de l'empyème souvent.

Il est fréquent dans les abcès divers (77 fois sur 100, d'après Janowski). On le retrouve dans bien des cas d'otites, de conjonctivites, de parotidites; dans le pus de certaines cystites et urétrites; dans le pus de certaines pleurésies purulentes (4).

Pénétrant dans le sang, il peut déterminer de l'infection purulente, de l'endocardite ulcéreuse, etc. D'après Rosenbach, il se trouverait surtout dans le pus de teinte jaunâtre. Garré (5) l'a signalé dans le sang d'un malade affecté d'ostéomyélite. Il a été rencontré dans le tartre dentaire et l'enduit lingual, par Vignal (6), où il est peut-être en rapport avec la présence de dents cariées, et existe très souvent sur la peau à l'état normal; on l'a souvent constaté sous les ongles.

Il se trouve fréquemment en association avec d'autres microbes pathogènes, avec le *Streptocoque pyogène*, avec le *Bacille de la morve*, avec le *Pneumocoque*, le *Bacille de l'influenza*, le *Bacille typhique*, le *Bacille de la pourriture d'hôpital*, le *Bacille de la tuberculose*, modifiant plus ou moins les processus déterminés habituellement par ces microbes.

(1) Mircoli, Heilserum gegen Staphylococcus (*Centralbl. für Bakt.*, XXIV, 1898, p. 69). — Bail, *Berlin. klin. Wochenschr.*, 17 octobre 1898. — Petersen, Ueber Immunisierung und Serumtherapie bei der Staphylomycose. Thèse de Heidelberg, 1897.

(2) J. Courmont, Sur les propriétés bactéricides ou microbiophiles du sérum de lapin, suivant que cet animal est vacciné contre le Staphylocoque pyogène ou prédisposé à cette infection (*Arch. de physiol.*, 1895). — Nicolas et Lesieur, Étude sur le pouvoir bactéricide et atténuant pour le Staphylocoque pyogène du sérum d'une chèvre vaccinée avec des cultures de cet agent microbien (*Soc. de Biol.*, 26 janvier 1901). — Doyen, Sérothérapie antistaphylococcique (*Bull. de l'Acad. de méd.*, 29 juillet 1902).

(3) Wright, On the treatment of acne, furonculosis and sycosis by therapeutic inoculation of Staphylococcus vaccine (*Brit. med. Journ.*, 1904, n° 2262).

(4) G. Gross, Sur deux cas de pleurésie purulente à Staphylocoques dorés purs (*Gazette hebd. de méd. et de chir.*, 11 décembre 1898).

(5) Garré, *loc. cit.*, p. 440.

(6) Vignal, Recherches sur les microorganismes de la bouche (*Arch. de physiol.*, 1886, n° 8, p. 366).

Dans le milieu extérieur, il paraît être commun. Pasteur l'a signalé depuis longtemps dans l'eau. Il est très répandu dans des milieux naturels les plus variés, sur la peau de l'homme et des animaux, dans l'air, les eaux, les poussières, etc. Il est fréquent dans la bouche, dans la salive, dans le contenu intestinal, dans la bile normale. D'après Achard et Phulpin, c'est le microbe qui envahit le plus rapidement le cadavre après la mort, devançant souvent les espèces de putréfaction. Denys (1) a signalé sa présence en abondance dans une viande ayant causé chez les consommateurs des symptômes d'intoxication.

On a rencontré ce même microbe dans le pus d'abcès de beaucoup de mammifères et de suppurations d'oiseaux. Lucet (2) l'a trouvé comme cause d'une épidémie d'ostéo-arthrite infectieuse chez de jeunes oies et a pu reproduire avec des cultures pures la même épidémie chez des oisons. Charrin le donne même comme la cause d'une maladie épidémique ayant sévi sur les goujons du Rhône, ce qui démontre que les animaux à sang froid ne sont même pas à l'abri de ses atteintes.

Il joue un rôle considérable en pathologie, et en pathologie humaine principalement. C'est l'agent le plus commun des suppurations, de la pyémie. Il vient compliquer un grand nombre de maladies infectieuses occasionnant des infections secondaires; en particulier l'association de ce microbe avec le *Bacille de Lœffler* dans la diphtérie est d'un pronostic plutôt grave.

En dermatologie, on doit lui attribuer une grande importance; il est des plus commun, associé souvent avec d'autres microbes saprophytes, quelquefois avec des pathogènes, dans bien des lésions cutanées, impétigo, acné, dermatites diverses.

RECHERCHE ET DIAGNOSTIC

On le trouve facilement dans le pus, dans le sang; sur les préparations traitées par la méthode de Gram, il garde la coloration. Une certitude plus grande est donnée par les ensemencements qui donnent des cultures d'aspect suffisamment caractéristique. L'inoculation aux animaux indique le degré de virulence.

La réaction d'agglutination peut servir. Silvestrini (3) aurait observé dans deux cas de staphylococcie que le sérum sanguin des malades agglutinait nettement les cultures de Staphylocoque doré. Nicolas et Lesieur (4) ont obtenu aussi des effets marqués d'agglutination, mais d'une manière trop variable pour qu'il soit possible d'être nettement affirmatif. Kolle et Otto (5) disent qu'il est possible, par l'agglutination, de distinguer les Staphylocoques pathogènes des Microcoques saprophytes. Pour beaucoup, l'agglutination est trop irrégulière pour qu'on puisse en tirer profit.

(1) Denys, *Bull. de l'Acad. roy. de méd. de Belgique*, 1894, p. 605.

(2) Lucet, De l'ostéo-arthrite aiguë infectieuse des jeunes oies (*Ann. de l'Inst. Pasteur*, VI, 1892).

(3) Silvestrini, Potere agglutinante del sangue sul culture in brodo di stafilococco in due casi di infezzione stafilococcica (*Settimana med.*, 2 avril 1878).

(4) Nicolas et Lesieur, Sur l'agglutination du *Staphylococcus aureus* par le sérum d'animaux vaccinés et infectés (*Soc. de Biol.*, 26 janvier 1901).

(5) Kolle et Otto, Die Differenzierung der Staphylokokken mittelst der Agglutination (*Zeitschr. für Hygiene*, XLI, 1902, p. 369).

Lucet (1) a décrit sous le nom de *Staphylococcus pyogenes bovis* un Microcoque pyogène qui lui paraît spécial aux suppurations de l'espèce bovine. Il ne liquéfie pas la gélatine, donne sur la gélose une très maigre culture grisâtre, un trouble passager dans le bouillon et une mince couche crayeuse mate sur pomme de terre. Il ne produit rien en inoculation, chez le cobaye et le lapin. De Jong (2) en fait aussi un type distinct du *Staphylocoque doré*.

MICROCOCCUS PYOGENES ALBUS Rosenbach.

(*Staphylococcus pyogenes albus : Staphylocoque blanc.*)

Il accompagne très fréquemment dans le pus le *Micrococcus pyogenes aureus* dont il possède toutes les apparences, de telle sorte qu'il est absolument impossible de les distinguer dans des préparations microscopiques de ce produit pathologique. Rosenbach dit qu'il se rencontre surtout dans les pus de couleur blanchâtre. D'après Passet, il serait plus fréquent que le précédent. Lannelongue (3) l'a isolé seul du pus de certaines ostéomyélites. Vignal l'a signalé dans le tartre dentaire avec le premier ; il a été aussi rencontré sur la peau normale. Beaucoup le considèrent comme une simple variété du précédent ; Rodet et Courmont disent avoir vu le *Staphylocoque doré* se transformer en *Staphylocoque blanc*, en le cultivant à une haute température. Les expériences d'Achard et Galliard (4) montrent bien qu'il existe entre le *Staphylocoque doré*, le *Staphylocoque blanc* et le *Staphylocoque citrin* des différences physiologiques notables.

Cultures. — Les colonies des cultures sur plaques ont la même forme que celles du *Micrococcus pyogenes aureus* ; la gélatine liquéfiée reste toujours laiteuse, blanchâtre, et ne se teint jamais de jaune.

Sur *gélatine*, en piqûre, il se développe exactement comme l'autre, mais la liquéfaction est plus lente à se produire. C'est surtout avec lui que s'observe pendant longtemps la forme de culture représentée figure 195, déjà citée pour l'espèce précédente, obtenue en touchant simplement la surface de gélatine du tube avec le fil d'inoculation. La gélatine liquéfiée est blanche, laiteuse ; elle laisse déposer un sédiment blanc, épais. On ne remarque pas à sa surface les flocons denses qui s'observent chez le premier.

Sur *gélose*, à 30°-35°, il se développe moins abondamment que son congénère. Il forme d'abord des taches blanches qui confluent en une large couche blanc mat, grisâtre, souvent un peu irisée, ne faisant jamais une forte saillie. Les cultures présentent aussi une grande viscosité.

Sur *pomme de terre*, il donne une membrane très mince, sèche.

(1) Lucet, Recherches bactériologiques sur la suppuration chez les animaux de l'espèce bovine (*Ann. de l'Inst. Pasteur*, VII, 1893, p. 325).

(2) De Jong, Ueber Staphylococcus pyogenes bovis (*Centralbl. für Bakt.*, XXV, 1899, p. 13 et 64).

(3) Lannelongue et Achard, Les microbes de l'ostéomyélite aiguë dite *infectieuse* (*Sem. méd.*, 1890, p. 84). — Salducci, De l'ostéomyélite chronique d'emblée due au Staphylocoque blanc à l'état de pureté. Thèse de Montpellier, 1898.

(4) Achard et Galliard, Contribution à l'étude biochimique des genres Tétragène et Staphylocoque (*Arch. de méd. expér.*, XI, 1899, p. 96).

Il résiste pendant un temps très long à la privation d'air.

Des recherches précises sur son action pathogène font encore défaut. Ribbert, dans son mémoire précité, a expérimenté à l'aide de cultures mélangées des deux premières espèces, en paraissant admettre leur identité d'action. C'est aussi l'opinion à laquelle se rattachent, sans preuves directes toutefois, la plupart des auteurs (1) et particulièrement Rodet et Courmont dans leurs mémoires précités. D'ailleurs, en cultivant du *Staphylocoque doré* sur des milieux fortement peptonisés et très peu peptonisés, on obtient souvent dans le premier cas des cultures caractéristiques bien jaunes et dans le second des cultures presque complètement blanches.

Les produits toxiques du *Staphylocoque blanc* seraient identiques à ceux du *Staphylocoque doré*, d'après Neisser et Wechsberg (Voy. p. 446).

D'après Tissier et Martelli (2), le *Staphylocoque blanc* serait un des agents aérobies de la putréfaction de la viande. Il y jouerait un rôle important, agissant sur les matières albuminoïdes, en donnant des corps amidés, de l'ammoniaque et un peu d'indol, et sur les matières sucrées en donnant des acides lactique et acétique.



Fig. 195. — Culture sur gélatine après simple piqûre superficielle.

MICROCOCCUS PYOGENES CITREUS Passet.

(*Staphylococcus pyogenes citreus.*)

Passet (3) le donne comme assez fréquent dans le pus avec les précédents. Bonome (4) l'a trouvé seul, avec le *Bacille de la tuberculose* dans un cas de tuberculose de la plèvre.

Les caractères des cultures sont ceux du *Micrococcus pyogenes aureus*, sauf la coloration, qui est d'un jaune-citron foncé. Pour beaucoup, il ne serait qu'une simple variété de ce dernier.

MICROCOCCUS CEREUS ALBUS Passet.

(*Staphylococcus cereus albus.*)

Passet a isolé cette espèce du pus. Elle ne paraît avoir aucune action nuisible sur l'organisme ; c'est encore à vérifier (5) ; les inoculations expérimentales sont toujours restées sans effet, même avec des doses très fortes. Elle peut se rencontrer dans l'intérieur des globules de pus et s'y trouve alors en diplocoques. Dans du pus d'urétrite, il peut y avoir confusion avec le Gonocoque, mais ce dernier se décolore par la méthode de Gram, qui laisse notre espèce colorée.

(1) Voy. Bonome, Contributions à l'étude des Staphylocoques pyogènes (*Arch. ital. de biol.*, t. VIII, p. 10).

(2) Tissier et Martelli, Recherches sur la putréfaction de la viande de boucherie (*Ann. de l'Inst. Pasteur*, XVI, 1902, p. 865).

(3) Passet, Untersuchungen über die Aetiologie der eitrigen Phlegmone des Menschen Berlin, 1883.

(4) Bonome, *loc. cit.*,

(5) Grixoni, Due casi di setticemia da Micrococcus cereus albus (*Giorn. med. d. r. esercito*, août 1898).

Les coccus ont un diamètre très irrégulier, qui varie de 0,6 μ à 0,16 μ ; ils sont isolés, disposés par deux, en petits amas ou en courtes chaînes.

Sur *plaques de gélatine*, il se développe, au bout de trois jours, des colonies rondes, à bords lisses, légèrement granuleuses, qui s'étalent à la surface de manière à former de petites taches blanches. La gélatine n'est pas liquéfiée.

Sur *gélatine*, en piqûre, on obtient, en trois ou quatre jours, une culture blanche, formée souvent de petites masses perlées contiguës ; à la surface se trouve une tache grisâtre, mate, ressemblant à une mince pellicule de cire blanche.

Sur *gélose*, on a d'abord des colonies rondes, d'un blanc mat, ressemblant à des gouttelettes de stéarine, puis un large revêtement blanc à teinte grisâtre, à bords irréguliers, très sinueux, parfois dentés. Souvent la culture est formée de petites colonies rondes se touchant ou se confondant. Les caractères des cultures sur sérum sont identiques.

Sur *pomme de terre*, il se forme une couche grisâtre, plus épaisse au milieu qu'aux bords.

Dans le *bouillon*, le développement est rapide à une température de 30°-35°.

Le *lait* n'est pas modifié.

On ne constate pas de formation d'indol dans les cultures.

J'ai rencontré cette Bactérie dans une eau de puits (1).

Cette espèce est peut-être à identifier avec quelque saprophyte.

MICROCOCCUS CEREUS FLAVUS Passet.

(*Staphylococcus cereus flavus.*)

Encore une espèce rencontrée dans le pus par Passet. Très voisine de la précédente par les caractères des éléments, elle s'en distingue surtout par la coloration jaune de ses cultures. Elle ne liquéfie pas la gélatine et forme un revêtement jaune-citron sombre, à reflet mat, ressemblant à une goutte de cire jaune, à bords irréguliers, un peu épaissis. En piqûre, il se produit dans le canal une bande grise, formée de très petites colonies rondes, accolées les unes aux autres.

Les inoculations sous-cutanées et intraveineuses n'ont fourni aucun résultat.

Cette espèce et la précédente agissent peut-être en association bactérienne, en favorisant l'action des espèces pathogènes vraies, comme on sait que le font beaucoup de saprophytes. Comme la précédente, elle n'est peut-être qu'un des Microcoques saprophytes jaunes communs partout.

MICROCOCCUS VIRIDIS FLAVESCENS Guttmann.

Guttmann (2) a trouvé ce *Micrococcus* dans la lymphe d'une pustule

(1) Macé, Quelques Bactéries des eaux de boisson (*Ann. d'hyg.*, 1888).

(2) Guttmann, Bacteriologische Mitteilungen über Varicellen (*Berlin. klin. Wochenschr.*, n° 46, p. 802).

de varicelle, en compagnie du *Micrococcus pyogenes aureus* et du *Micrococcus cereus albus*.

Ce sont des coccus sphériques réunis par deux ou plus en petits amas. Ils ont l'aspect et les dimensions du *Micrococcus pyogenes aureus*; aussi n'est-il pas possible de les distinguer dans les préparations. Les cultures seules le permettent; elles s'obtiennent du reste facilement sur tous les milieux en présence de l'air.

Sur *plaques de gélatine*, il s'est formé, après quarante-huit heures, des colonies circulaires, à bords lisses, colorées en vert jaunâtre. Légèrement granuleuses au début, elles deviennent tout à fait homogènes. Elles ne liquéfient pas la gélatine.

Sur *gélatine*, en piqûre, ce *Micrococcus* donne une mince tige verdâtre dans le canal, et à la surface une petite colonie de même nuance : il ne se produit jamais de liquéfaction.

Sur *gélose* ou sur *sérum*, il se développe une culture verdâtre, qui s'accroît rapidement. Le bouillon ensemencé se trouble en peu de temps.

Cette Bactérie semble n'avoir aucune action sur les animaux; c'est probablement aussi un saprophyte vulgaire.

MICROCOCCUS DANS LE CLOU DE BISKRA.

Duclaux (1) a obtenu un Microcoque qu'il a cru spécial de cultures du sang d'un malade affecté de la maladie, commune en Afrique et en Asie, désignée sous les noms de *clou de Biskra*, *clou de Gafsa*, *bouton du Nil*, *bouton d'Alep*, *bouton d'Orient*, *ulcère de Delhi*, etc. Brocq et Veillon (2) disent avoir obtenu d'un bouton d'Alep vrai un *Streptothrix* se rapprochant de l'*Actinomyces* et Nicolle et Nourry-Bey un Streptocoque voisin du *Streptocoque pyogène*, peu virulent et non influençable par le sérum de Marmorek. Poncet (3) décrit, à côté de Microcoques, des Bacilles dont la longueur varie de 1 μ à 8 μ. Nicolle et Nourry-Bey ont obtenu du bouton d'Alep une culture pure d'un Streptocoque.

L'affection débute par une série de petits boutons confluents, qui peuvent recouvrir une surface large comme la main. La peau enflammée s'ulcère; l'ulcération, qui a souvent des bords taillés à pic comme un chancre, s'emplit d'une croûte brunâtre. La durée de la maladie est en général fort longue ; les plus heureux sont guéris en six mois, d'autres seulement après un an ou deux ans. La guérison se fait spontanément et laisse une cicatrice profonde. La maladie, reconnue depuis longtemps pour éminemment contagieuse, est pour ainsi dire endémique en bien des endroits (4).

Les recherches récentes démontrent que cette maladie est causée par un parasite spécial, un Sporozoaire, le *Leishmannia furunculosa* (5),

(1) Duclaux et Heydenreich, Étude d'un microbe rencontré chez un malade atteint de l'affection appelée *clou de Biskra* (*Ann. de derm. et de syph.*, 25 juillet 1884, et *Arch. de physiol.*, 1884, p. 106).

(2) Brocq et Veillon, Bouton d'Alep (*Soc. de derm.*, 20 mai 1897).

(3) Poncet, Note sur le clou de Gafsa (*Ann. de l'Inst. Pasteur*, 1887, p. 518).

(4) Loustalot, Le bouton de Biskra. Thèse de Paris, 1888.

(5) Nicolle et Manceaux, Recherches sur le bouton d'Orient (*Ann. de l'Inst. Pasteur*, XXIV, 1910, p. 673).

qui se trouve en abondance dans le contenu des lésions. Les formes microbiennes qu'on y rencontre sont dues à des infections secondaires, surtout par les espèces pyogènes ordinaires. Le Microcoque de Duclaux, par exemple, a tous les caractères du *Staphylocoque doré*.

La transmission du parasite se fait probablement par un insecte piqueur.

MICROCOCCUS PYOSEPTICUS Richet et Héricourt.

(*Staphylococcus pyosepticus.*)

Cette Bactérie a été isolée par Ch. Richet et Héricourt (1) d'une tumeur carcinomateuse non ulcérée, située dans le tissu cellulaire de la marge de l'anus d'un chien.

Elle présente de grandes ressemblances avec le *Micrococcus pyogenes albus*, mais possède des propriétés pathogènes bien spéciales ; il n'y a peut-être ici qu'une différence de race. Cette espèce diffère surtout par une très grande virulence pour le lapin, alors qu'elle paraît à peu près inoffensive pour le chien.

Les différences de culture de ces deux espèces sont peu marquées. Le *Micrococcus pyosepticus*, dans des conditions identiques, liquéfie plus tardivement la gélatine et se développe moins vite dans le bouillon que le *Staphylocoque blanc* ; l'optimum de température est 36°-39°. Dans le bouillon à 38°, après vingt-quatre heures, on observe dans le liquide, avec le *Micrococcus pyosepticus*, des grumeaux visqueux, blanchâtres, qui se laissent tomber au fond, tandis qu'avec le *Staphylococcus albus* le liquide est uniformément trouble et forme un mince dépôt pulvérulent.

Les caractères pathogènes sont plus tranchés. L'inoculation au lapin d'une petite quantité de culture de *Micrococcus pyosepticus* produit en très peu de temps un énorme œdème gélatineux, tandis que la même quantité de *Staphylocoque blanc* ne donne qu'une minime infiltration. Chez le chien, l'injection sous-cutanée de *Micrococcus pyosepticus* donne au bout de vingt-quatre heures un abcès à forme hémorragique avec sphacèle de la peau, mais ni œdème ni mort.

Les cultures s'atténuent par l'âge ou la chaleur : l'inoculation de cultures atténuées confère l'immunité.

Cette espèce tue les cobayes, les lapins et les pigeons, mais ne tue pas les chiens.

L'injection de cultures au chien à doses progressivement croissantes lui confère rapidement l'immunité complète à l'égard du microbe. En transfusant dans le péritoine de lapins du sang de chiens ainsi immunisés, Héricourt et Ch. Richet ont pu les faire résister à l'infection par le microbe ; le sang des réfractaires et des immunisés contient des principes qui confèrent l'immunité ; c'est là la première expérience et les premiers résultats heureux de sérothérapie.

(1) Ch. Richet, Étude physiologique sur un Microbe pyogène et septique (*Arch. de méd. expér.*, I, 1889, p. 673). — Héricourt et Ch. Richet, Sur un microbe pyogène et septique et sur la vaccination contre ses effets (*Soc. de Biol.*, 1888).

MICROCOCCUS PYOGENES.

(*Streptococcus pyogenes : Streptocoque pyogène ; Streptocoque de l'érysipèle.*)

ATLAS DE MICROBIOLOGIE, PL. IX.

Il est commun dans le pus où sa présence a été signalée par Ogston en 1881 (1), puis Passet (2) et Rosenbach (3). Pasteur et Doléris (4) l'avaient observé dès 1880 dans le sang de femmes atteintes de septicémie puerpérale. C'est encore certainement le microbe signalé par Nepveu dans la sérosité du sang des plaques d'érysipèle que cet auteur décrit comme proche du *Bacterium punctum* d'Ehrenberg. Fehleisen l'a obtenu en culture pure de la peau érysipélateuse en 1883 ; son *Streptocoque de l'érysipèle* (*Streptococcus erysipelatos*) doit être identifié comme espèce avec le *Micrococcus pyogenes*.

Cette espèce présente une assez large variabilité de caractères (5) ; certains auteurs même ont pris ces différences comme base pour établir des types spécifiques distincts. Lingelsheim (6), par exemple, distingue un *Streptococcus longus* à chaînettes longues, à virulence souvent très marquée, et un *Streptococcus brevis* à chaînettes courtes et à virulence moindre ; Behring (7) se sert des différences de culture dans le bouillon ; Marot (8) des différences d'aspect de cultures sur pomme de terre. Il semble bien que l'on ait dans tous ces cas affaire au même type spécifique, dont plusieurs caractères varient facilement, dans de certaines limites, sous des influences diverses, au premier rang desquelles doivent assurément se placer la nature et les conditions du milieu où vit le microbe (9).

Cette question semble devoir se résoudre par la distinction de nombreuses races, modalités plus ou moins différenciées d'un même type spécifique. De telle sorte qu'une description classique doit s'adresser plutôt à un *Streptocoque* quelque peu théorique ou schématique. En tout cas, il n'y a plus lieu maintenant de décrire un *Streptocoque du pus* et un *Streptocoque de l'érysipèle* ; il n'y a là que question de virulence variable, de résistance du sujet, état de la peau, etc. Il peut même y avoir plus ; on peut citer une série continue de types entre le *Streptocoque pyogène* et le *Pneumocoque*.

(1) OGSTON, *loc. cit.*, p. 437.
(2) PASSET, *loc. cit.*, p. 437.
(3) ROSENBACH, *loc. cit.*, p. 437.
(4) DOLÉRIS, La fièvre puerpérale. Thèse de Paris, 1880.
(5) ZENONI, Ueber die Frage der Homologie der Streptokokken (*Centralbl. für Bakt.*, XXI, 1897, p. 10).
(6) LINGELSHEIM, Eigenschäften verschiedener Streptokokken (*Zeitschr. für Hygiene*, X, 1892, p. 331).
(7) BEHRING, Untersuchungergebnisse betreffend den Streptococcus longus (*Centralbl. für Bakt.*, XII, 1892, p. 192).
(8) MAROT, Un Streptocoque à culture apparente sur pomme de terre (*Arch. de méd. expér.*, 1893, p. 548).
(9) WIDAL et BEZANÇON, Étude des diverses variétés de Streptocoques (*Arch. de méd. expér.*, mai 1896).

MORPHOLOGIE

Caractères microscopiques. — Dans le sang ou dans le pus, on trouve ces Micrococques rarement isolés ou unis à deux, d'habitude en chaînettes assez courtes, de 5 à 10 éléments en moyenne (fig. 196). Les coccus sont souvent arrondis ; ceux des cultures jeunes, en pleine végétation, paraissent fréquemment ovalaires, prêts à se diviser ; parfois on en observe à grand axe vertical, comme le représente la figure 202. Dans les cultures, la grandeur des chaînettes augmente ; celles qui se développent dans des bouillons bien nutritifs, par exemple, peuvent être formées d'un nombre considérable de coccus, souvent plusieurs centaines. Les coccus trouvés dans le pus mesurent 0,8 μ à 1 μ en moyenne, ceux de l'érysipèle sont plus petits. Ceux des cultures varient dans de plus larges limites ; ils sont très petits dans les vieilles cultures ; dans les cultures en plein développement, au contraire, certains éléments des grandes chaînes atteignent et dépassent même le double du diamètre des voisins, ce qui les a fait considérer, sans autre raison du reste, comme des arthrospores par certains auteurs.

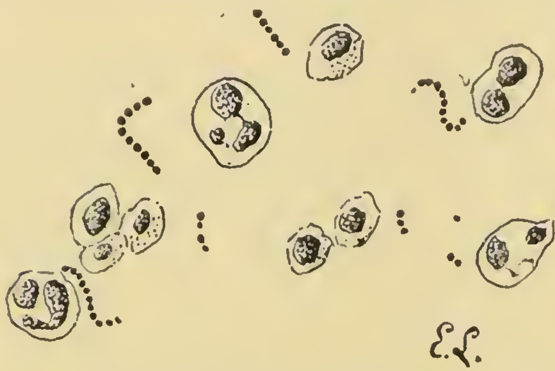


Fig. 196. — Pus d'un phlegmon sus-aponévrotique de la cuisse avec *Streptocoques pyogenes*.

Un même Streptocoque peut présenter des formes très différentes suivant le milieu de culture où il vit (fig. 197). Les milieux acidulés donnent surtout de longues chaînettes (1).

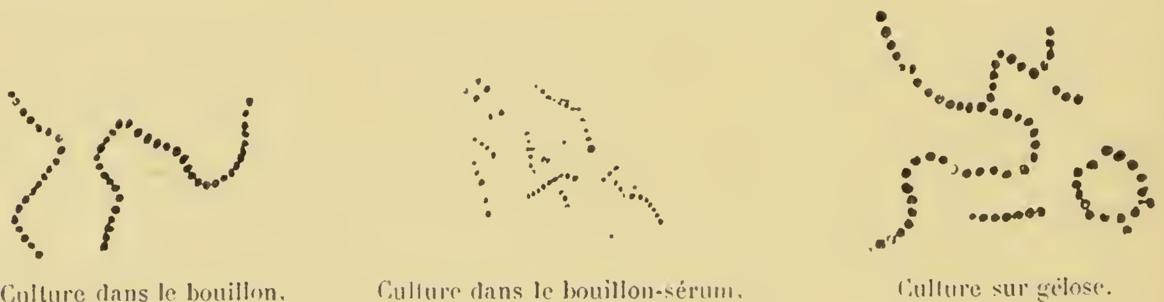


Fig. 197. — Formes d'un même Streptocoque cultivé sur milieux différents (d'après Zenoni).

La taille des articles est souvent très irrégulière. Certains grains sont susceptibles d'acquérir un volume considérable ; d'autres sont très fins, et ceci souvent dans la même chaînette. La figure 199 montre bien l'extrême diversité des aspects que l'on peut observer. Vincent a décrit une ramification qui est également bien nette dans plusieurs des figures ci-dessous.

Parfois, les éléments ont une auréole bien visible, quelquefois même une capsule très nette (fig. 198), si marquée qu'on peut parfois éprouver un réel embarras à distinguer un *Streptocoque pyogène* avéré d'un

(1) Vincent, Sur les variations morphologiques du Streptocoque et sur un Streptocoque ramifié (*Arch. de méd. expér.*, XIV, 1902, p. 521).

Pneumocoque. Schottmüller (1) a même établi sur ce caractère une espèce distincte, le *Streptococcus mucosus*, à colonies plus épaisses et plus visqueuses que les colonies ordinaires.

L'immobilité est un signe de valeur, mais pas absolu. Il est des chaînettes qui montrent des contractions et des étirements si nets qu'on ne peut leur contester une certaine mobilité.

Les figures 200 à 205 montrent les principaux aspects que l'on peut observer dans les préparations.

Coloration. — Le *Streptocoque pyogène* se colore très facilement aux diverses couleurs d'aniline. Certains éléments peuvent ne pas prendre la couleur ou se colorer très difficilement. Le plus souvent, traité par la méthode de Gram, *il reste coloré*. Étienne (2) a obtenu d'une angine à fausses membranes un Streptocoque se décolorant par la méthode de Gram. Lemoine (3) a observé la même particularité pour certaines cultures seulement d'un Streptocoque isolé de l'érysipèle, d'autres cultures provenant de la même semence présentant la réaction la plus habituelle que l'on peut considérer comme normale, gardant la coloration par la méthode en question. Quelquefois on rencontre des *Streptocoques* qui ne gardent la coloration qu'après un passage sur gélose.

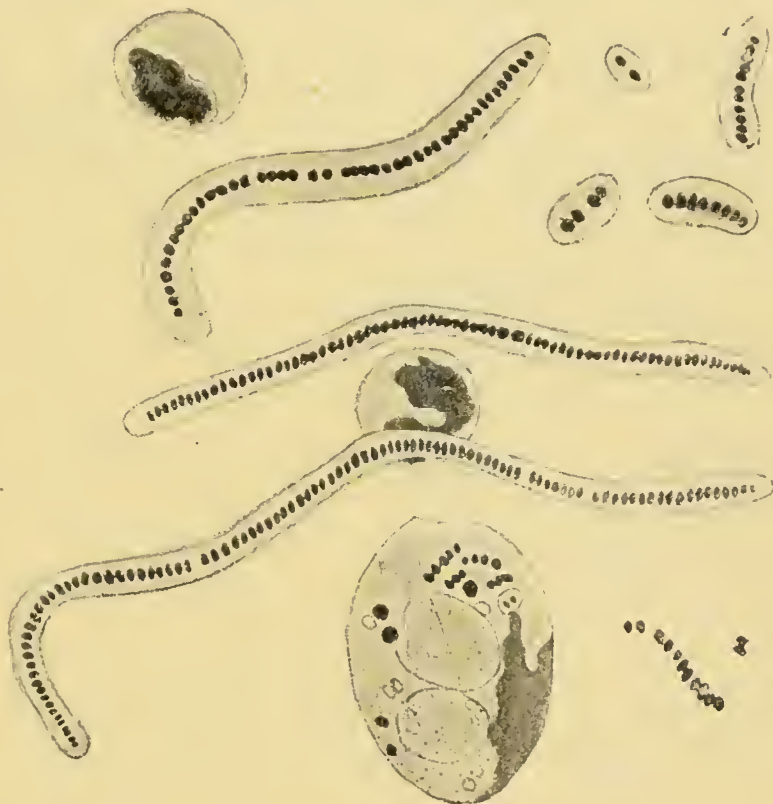


Fig. 198. — Streptocoques pyogènes encapsulés du liquide péritonéal de cobaye inoculé (d'après Bordet).

Cultures. — Ce microbe est un anaérobie facultatif. Il paraît conserver plus longtemps ses propriétés, entre autres sa virulence, lorsqu'il est à l'abri de l'oxygène. Il se cultive lentement à une température de 15° à 20°, plus vite à l'étuve ; son optimum se trouve vers 37°. Il pousse encore vers 45°, mais plus du tout à 47°. Il se développe mal dans les milieux un peu acides, au mieux dans les milieux additionnés de sérum ou de sang.

Cultures en bouillon. — Le bouillon neutre ou légèrement alcalin est un très bon milieu pour le *Streptocoque pyogène*. On remarque ici des différences assez marquées suivant la provenance du microbe : certains *Streptocoques* se cultivent sans troubler le bouillon ;

(1) Schottmuller, Die Artunterscheidung der für den Menschen pathogenen Streptokokken durch Blutagar (*Munch. med. Wochenschr.*, 1903, p. 849).

(2) Étienne, Note sur les Streptocoques décolorables par la méthode de Gram (*Arch. de méd. expér.*, 1895).

(3) Lemoine, Variabilité dans la forme et les caractères de culture du Streptocoque (*Arch. de méd. expér.*, 1895).

d'autres, au contraire, le troublent uniformément. Behring (1), Lingelsheim (2) et d'autres (3) ont voulu faire de cette différence de culture un caractère spécifique; il ne semble pas que sa constance soit suffisamment établie et, de plus, il paraît sous la dépendance de la réaction du milieu.

Le *Streptocoque pyogène* du pus donne des cultures du premier type. Vers 30°, dès le troisième jour, le microbe forme sur les parois du vase un piqueté blanchâtre, léger d'abord, puis de plus en plus dense, adhérent au vase. Après huit jours, le piqueté s'arrête et il s'est formé au fond un sédiment grisâtre, floconneux, qui se répand dans le liquide après agitation; par le repos, le liquide redevient entièrement clair. Les flocons sont formés de très longues chaînettes intriquées. Le Streptocoque que Kurth (4) a obtenu du sang scarlatineux se comporte de même.



Fig. 199. — Formes anormales du Streptocoque pyogène, choisies dans un grand nombre de préparations de pus, de sang, de cultures d'origine diverse.

Dans les angines (5), les bronchopneumonies, les pleurésies purulentes, l'érysipèle parfois, on isole un *Streptocoque pyogène* troublant plus ou moins le bouillon, parfois très rapidement, au bout de douze heures. Le liquide peut s'éclaircir en deux ou trois jours, ou rester plus long-

(1) Behring, *loc. cit.*

(2) Lingelsheim, *loc. cit.*

(3) Pasquale, Vergleichende Untersuchungen über Streptokokken (*Beitr. zur Anat. von Ziegler*, XII, p. 443).

(4) Kurth, Unterscheidung der Streptokokken (*Arb. aus dem kaiserl. Gesundheitsamte*, VII, 1891, p. 389).

(5) Barbier, Sur un Streptocoque trouvé dans les angines à fausses membranes *Arch. de méd. expér.*, 1892, p. 827). — Veillon, Recherches sur l'étiologie et la pathogénie des angines aiguës non diphtériques. Thèse de Paris. 1894.



Fig. 200. — Formes à éléments très petits.



Fig. 201. — Formes où les éléments sont disposés en diplocoques.



Fig. 202. — Formes à éléments allongés verticalement.



Fig. 203. — Formes agglomérées (*Streptococcus conglomeratus* de Kurth).



Fig. 204. — Formes longues.



Fig. 205. — Formes très longues.

Fig. 200 à 205. — Formes diverses du Streptocoque pyogène.

temps trouble. On peut même observer une forme de culture intermédiaire; le liquide n'est pas réellement trouble, mais prend, par agitation surtout, un aspect ondoyant, comme le vin malade de la graisse, aspect dû à la présence de très longues chaînettes restant en suspension.

Dans les deux cas, le bouillon devient assez rapidement acide; le microbe forme de l'acide lactique, probablement aux dépens des hydrates de carbone. Cette acidité nuit à la conservation de la vitalité du microbe; aussi les cultures périssent-elles assez vite. On peut les conserver plus longtemps vivantes en usant de bouillon additionné de craie en poudre. Pour les entretenir, il faut les réensemencer avant que l'acidité apparaisse.

Si l'on filtre sur bougies ces bouillons de culture, même très jeunes, le filtrat se montre impropre à donner des cultures après nouvel ensemencement.

Dans les cultures en bouillon, la multiplication du microbe s'arrête vite; après trois ou quatre jours, quelquefois moins d'une journée, la culture n'augmente plus. Marmorek (1) a observé qu'en ajoutant au bouillon une petite quantité de leucine et de glycocolle les cultures sont beaucoup plus abondantes et plus durables. La solution de leucine s'obtient en ajoutant 0gr,40 de leucine à 150 grammes de bouillon, chauffant à 60° et filtrant sur bougie. Celle de glycocolle, en dissolvant à 60° 0gr,50 de glycocolle dans 100 grammes de bouillon et filtrant sur bougie. On ajoute 10 grammes de chacune de ces deux solutions à 100 grammes de bouillon peptonisé. Le filtrat des cultures dans un tel milieu donne facilement des cultures après nouvel ensemencement.

Cultures sur plaques de gélatine. — En trente-six à quarante-huit heures, on obtient de petites colonies punctiformes, arrondies, granuleuses, qui, arrivées à la surface, s'étalent en petits disques transparents, un peu bombés, pouvant atteindre un demi-millimètre de diamètre. A un faible grossissement, elles apparaissent au début comme de petits disques légèrement jaunâtres à contours nets, à surface granuleuse. Les colonies plus âgées prennent une teinte un peu brunâtre et celles qui se trouvent à la surface laissent échapper de leurs bords de longs filaments serpentant en tous sens, constitués par des chaînes de nombreux coccus. La gélatine *n'est jamais liquéfiée.*

Cultures sur gélatine. — *En piqûre*, la culture est minime. A 20°, les colonies n'apparaissent guère avant quarante-huit heures dans l'épaisseur de la gelée. Ce sont de petites sphères blanches, opaques, restant isolées les unes des autres. A la surface, il se forme un petit disque blanc peu proéminent, qui ne dépasse guère le volume d'une petite tête d'épingle.

En strie, on observe en trente-six heures une colonie muqueuse, blanche, un peu transparente, surtout aux bords. Ces colonies peuvent reproduire grossièrement l'aspect de certaines feuilles, frondes de fougères ou feuilles d'acacia par exemple. C'est même là le caractère qui, d'après Rosenbach, permettait de différencier en cultures le *Streptocoque de l'érysipèle* du *Streptocoque pyogène*: le premier donnait une culture sur gélatine ressemblant à une feuille de fougère, le second une culture rappelant la feuille d'acacia. Ce sont là des caractères bien difficiles à apprécier nettement, d'autant plus qu'ils sont loin de présenter une constance absolue et que, dans une série assez nombreuse de cultures

(1) Marmorek, La toxine streptococcique *Ann. de l'Inst. Pasteur*, XVI, 1902, p. 169.

provenant d'une même semence, on trouvera souvent tous les passages de l'un à l'autre type.

L'accroissement de toutes ces cultures sur gélatine se termine vite, au bout de quatre à cinq jours. Souvent, après quatre à cinq semaines elles sont mortes.

Cultures sur gélose. — *En strie*, à 30°-35°, on obtient de petits mamelons blancs de 1 à 2 millimètres de diamètre, se développant sur toute la surface du tube, pouvant même devenir confluents et former une bande d'un blanc grisâtre qui rappelle parfois l'aspect d'une feuille composée comme la culture sur gélatine. La vitalité s'éteint vite; souvent, dès la quatrième culture il n'est plus possible d'obtenir une végétation.

Sur *plaques de gélose*, en frottis, les cultures apparaissent déjà après huit ou dix heures à 37°, comme de petites gouttes grisâtres, hyalines.

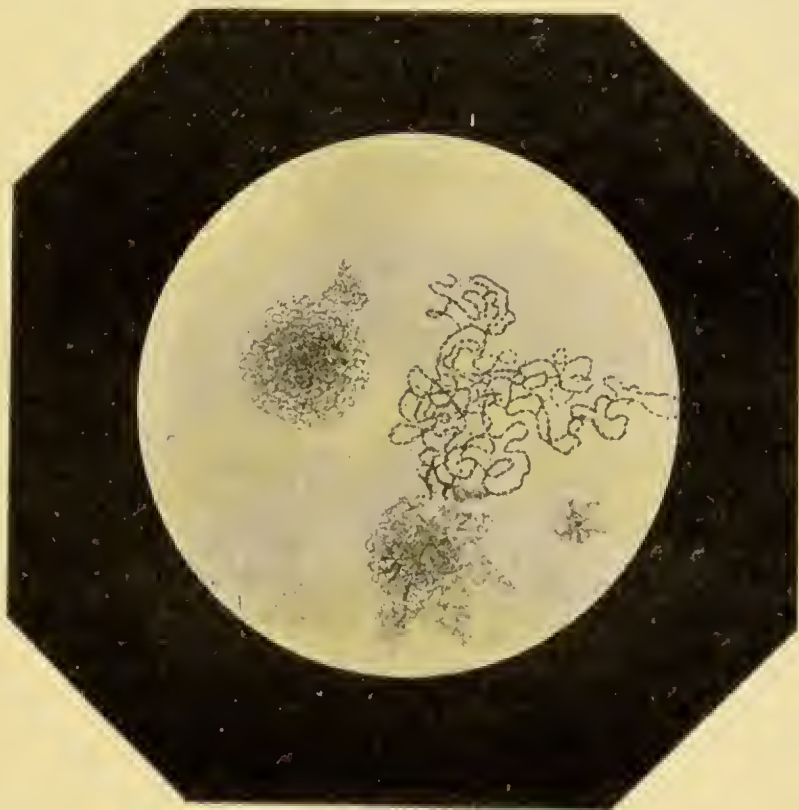


Fig. 206. — Culture sur plaques de gélose, en frottis. 80/1.

A un faible grossissement (fig. 206), ces colonies sont arrondies, d'un gris jaunâtre, à centre plus sombre, comme formées d'un pelotonnement de fils très légers. Un peu plus tard, après treize ou quatorze heures, on voit des prolongements quitter les bords pour se diriger sur la surface du milieu. Plus les colonies avancent en âge, plus les prolongements augmentent; après quarante-huit heures, une grande partie de la surface de la gelée est recouverte de ces prolongements sinueux, s'emmêlant souvent les uns avec les autres, constitués par de très longues chaînettes de Streptocoques. C'est un aspect très caractéristique.

Cultures sur sérum. — Dans le *sérum liquide*, les cultures ont l'aspect de celles dans le bouillon; elles y gardent cependant plus longtemps leur vitalité et en particulier leur virulence. Sur *sérum coagulé*, en *strie*, la culture rappelle celle sur gélose; les colonies sont plus nettes, ont moins de tendance à confluer et ressemblent, au début surtout, à de petits grains de semoule accolés à la gelée. Elles apparaissent souvent à 37° avant la dixième heure.

Cultures sur pomme de terre. — Le *Streptocoque pyogène* croît sur ce milieu sans donner de culture apparente à l'œil nu. Mais si, au bout de quelques jours, on racle la surface ensemencée, on observe de nombreuses chaînettes formées d'un petit nombre d'éléments. Marot (1) signale un Streptocoque de la bouche qui donne sur pomme de terre une culture formée après vingt-quatre heures de petits grains arrondis, séparés, presque transparents, devenant d'un blanc laiteux le second jour; j'ai obtenu la même forme de culture avec un Streptocoque isolé souvent des eaux de qualité douteuse.

Cultures dans le lait. — Ce microbe produit souvent, au bout de quelques jours, la coagulation de la caséine. Cette coagulation est d'ordinaire localisée en un point, à la partie la plus déclive de la culture, puis envahit ensuite toute la masse; la caséine se rétracte et abandonne un liquide tout à fait limpide. Cependant, cette modification est variable. Avec un Streptocoque de même provenance, la coagulation est tantôt rapide, tantôt très lente; elle peut même manquer complètement. Certaines variétés ne la déterminent jamais. La coagulation paraît dépendre de la formation d'acide lactique.

PROPRIÉTÉS BIOLOGIQUES

Vitalité. — Le *Streptocoque pyogène* est une espèce très sensible. Elle conserve mal sa vitalité en présence de l'air. Les cultures sur les milieux les plus favorables peuvent ne plus rien donner après huit jours; pour en conserver, il faut réensemencer souvent, même chaque jour. On a vu que, même avec un ensemencement journalier, la vitalité s'éteint vite sur gélose.

Dans le pus ou dans les poussières, il paraît résister plus longtemps à la dessiccation, quelques semaines au moins.

Bien que pouvant encore végéter à d'assez hautes températures (p. 457), il est très sensible aux élévations de température. Dans les cultures, il est tué à 52° en dix minutes (Sternberg), instantanément à 100°; il résiste également très peu aux antiseptiques, même faibles. Lorsqu'il est protégé par un vernis albumineux, pus desséché, sang desséché, il se montre un peu plus résistant.

L'action des antiseptiques est variable, à cause de la grande variabilité des types étudiés. L'acide phénique à 3 p. 100 paraît le tuer en moins d'une minute; le sublimé à 1 p. 1000 en dix à quinze secondes.

Virulence. — C'est la propriété qui nous intéresse le plus; c'est, par contre, aussi celle qui est sujette aux plus grandes variations. Dans la plupart des cultures, en particulier, la virulence s'atténue et même peut disparaître très vite, à tel point qu'un Streptocoque très virulent dans des produits naturels, sang ou pus par exemple, ne pourra se montrer que peu actif même en première culture. Cette diminution de la virulence paraît être sous l'influence directe des conditions extérieures. L'oxygène joue un grand rôle; les cultures conservées à l'abri de l'air, en pipettes scellées, gardent plus longtemps leur activité. La chaleur agit aussi; on arrive parfois à conserver la virulence d'une culture en la maintenant à zéro degré, dans la glace. Cette perte

(1) Marot, Un Streptocoque à culture apparente sur pomme de terre (*Arch. de méd. expér.*, 1893, p. 548).

de la virulence est un obstacle des plus sérieux pour l'expérimentation. D'après Marmorek (1), on peut l'éviter en se servant comme milieu de culture du sérum humain rendu nutritif; on prend deux parties de sérum humain et une partie de bouillon de bœuf peptonisé à 1 p. 100 (bouillon-sérum). On peut aussi employer le liquide d'ascite, moins favorable cependant que le sérum; la proportion du mélange est une partie de liquide d'ascite et deux parties de bouillon (bouillon-ascite). Des cultures successives dans le liquide le plus favorable conservent la virulence, mais ne l'exaltent pas. L'exaltation ne peut s'obtenir que par des passages successifs et répétés dans l'organisme animal; il est alors possible d'arriver à une virulence extrême que l'on voit notablement baisser dès qu'on met le microbe en culture dans les milieux habituels.

Produits formés dans les cultures. — Nous savons déjà que le *Streptocoque pyogène* produit de l'acide lactique dans bien des milieux; d'après Sieber-Schoumoff (2), ce serait en faisant fermenter les sucres. Tous les types de Streptocoques produisent de l'acide; la coagulation du lait se fait sous cette influence; certains produiraient un acide lactique gauche (Streptocoque de l'érysipèle, Streptocoque du sang scarlatineux), d'autres (Streptocoque du pus) de l'acide lactique inactif. On a cherché des caractères de différenciation des Streptocoques dans l'action variable sur diverses matières sucrées (3). On constate en outre des traces d'hydrogène sulfuré et parfois de l'ammoniaque, jamais d'indol.

Les cultures dans les liquides, dans le bouillon particulièrement, du *Streptocoque pyogène* virulent renferment, en outre, des produits solubles très intéressants. Roger (4) cultive un Streptocoque virulent sur bouillie de viande recouverte d'une petite couche d'huile, laisse cinq jours à l'étuve à 30°, exprime le liquide et le filtre; le produit tue le lapin à la dose de 13 à 30 centimètres cubes. De ce liquide, il a isolé une toxine précipitable par l'alcool, très active sur le lapin, agissant principalement sur la circulation. Cette toxine est détruite par une température de 100°. Ce même auteur a démontré que les cultures chauffées à 110° ou 120°, à l'autoclave, où les produits toxiques sont détruits ou transformés, possèdent une action vaccinante évidente, que manifeste aussi, mais à un degré moindre, le bouillon débarrassé de la toxine par addition d'alcool; ce qui démontre l'existence, à côté de produits toxiques favorisant naturellement l'action du microbe, d'une substance vaccinante à effet contraire, pouvant être utilisée contre l'infection.

Marmorek, avec un Streptocoque à virulence très exaltée, cultivé pendant trois mois dans le liquide bouillon-ascite dont il a été question plus haut, obtient, après filtration, une toxine qui tue le lapin en vingt-quatre à trente-six heures, à la dose de moins d'un centimètre cube. En se servant du bouillon additionné de leucine et de glycocolle, comme

(1) MARMOREK, Le Streptocoque et le sérum antistreptococcique (*Ann. de l'Inst. Pasteur*, IV, 1895, p. 593).

(2) SIEBER-SCHOUMOFF, Recherches sur les Streptocoques pathogènes (*Arch. des sc. biol. de Saint-Pétersbourg*, 1892, p. 265).

(3) SALOMON, Zur Unterscheidung der Streptokokken durch Kohlenhydrathaltigen Nahrböden (*Centralbl. für Bakt.*, Orig., XLVII, 1908, p. 1).

(4) ROGER, Produits solubles du Streptocoque (*Soc. de Biol.*, 1891).

il a été indiqué précédemment (p. 460), on obtient une multiplication durable du microbe et une production de toxine plus grande. Avec un microbe bien virulent, on peut déjà filtrer après huit jours ; la toxine tue le lapin à la dose d'un demi à un quart de centimètre cube.

Bonome et Bombicci croient que le principe toxique est une protéine contenue surtout dans le corps des microbes. D'après Marmorek, tous les Streptocoques d'origine différente donneraient la même toxine (1).

Les cultures, celles en bouillon-ascite surtout, possèdent une action hémolytique intense que leur enlève la filtration sur bougie Chamberland. L'hémolysine produite par le microbe, *hémolysine streptococcique*, dissout les globules rouges de l'homme et des divers animaux usités ; elle paraît dépourvue de toute toxicité (2). Tous les types de Streptocoques ne possèdent pas cette propriété hémolytique.

On a voulu faire de ce caractère un moyen de différenciation des Streptocoques pathogènes et des non pathogènes pour l'homme (3). Sa constance et son intensité sont trop variables pour qu'on puisse lui accorder une telle importance.

Cette hémolysine streptococcique est thermostabile ; elle supporte 56° pendant plus d'une demi-heure sans être sensiblement modifiée ; elle n'est détruite à cette température qu'après au moins dix heures. Une température de 70° la rend inactive, mais seulement après une heure ou deux de chauffage. Son action sur le sang est beaucoup plus rapide et plus énergique à 37°.

INOCULATION EXPÉRIMENTALE

Les effets sont ici des plus variables, suivant le degré de virulence du microbe injecté. Le lapin paraît être l'animal de choix. On l'inocule sous la peau ou dans les veines.

En *inoculation sous-cutanée*, à l'oreille, une dose de 1 centimètre cube de bouillon d'une culture vieille de deux à trois jours donne, lorsque le microbe n'est pas complètement dépourvu de virulence, tantôt de simples rougeurs érythémateuses ou une minime suppuration lorsque la virulence est faible, tantôt une plaque érysipélateuse ou un phlegmon de l'oreille dans le cas de virulence moyenne, tantôt enfin une septicémie généralisée avec mort souvent rapide et présence du Streptocoque dans les viscères dans le cas de haute virulence.

L'*injection intraveineuse* tue en vingt-quatre heures ou plus lentement, suivant le degré de virulence du microbe.

L'*injection intrapéritonéale* est aussi active que l'injection intraveineuse.

Par une série de passages dans l'organisme animal, la virulence d'un Streptocoque peut considérablement s'exalter, comme l'a démontré Marmorek (4). Il est alors nécessaire de continuer indéfiniment les

(1) Marmorek, La toxine streptococcique (*Ann. de l'Inst. Pasteur*, VI, 1902, p. 169).

(2) Besredka, De l'hémolysine streptococcique (*Ann. de l'Inst. Pasteur*, XV, 1901, p. 880).

(3) Baumann, Beiträge zur Unterscheidung der Streptokokken (*Münch. med. Wochenschr*, 1906, p. 1193). — Beitzke et Rosenthal, Zur Unterscheidung der Streptokokken mittelst Blutnährböden (*Arbeiten aus eim path. Inst. Berlin*, 1906).

(4) Marmorek, Le Streptocoque et le sérum antistreptococcique (*Ann. de l'Inst. Pasteur*, IX, 1895, p. 593).

passages, en injectant à un lapin neuf le sang de celui qui vient de mourir; le moindre passage dans un milieu de culture fait aussitôt notablement baisser la virulence acquise, sauf peut-être pour le milieu formé de sérum humain et de bouillon peptonisé dont il a été question plus haut. C'est ainsi que Marmorek est arrivé à obtenir dans ce milieu des cultures tuant le lapin à la dose de 1 milliardième de centimètre cube.

Les souris sont aussi très sensibles; les cobayes, les rats et les chiens beaucoup moins. L'âne et le cheval, le mouton surtout résistent bien aux Streptocoques de virulence moyenne, mais réagissent beaucoup aux injections de Streptocoques très virulents.

Grâce à la production par le microbe, dans l'organisme même, d'une hémolysine active, on trouve fréquemment à l'autopsie, surtout chez le lapin, le sang tout à fait transparent, laqué, hémolysé par suite de la destruction des globules rouges et de la diffusion de la matière colorante dans le plasma.

L'inoculation expérimentale peut reproduire chez l'animal presque toutes les manifestations déterminées naturellement chez l'homme par le microbe.

Roger (1), Monti (2), Vincent (3) ont montré qu'on pouvait exalter ou renforcer la virulence d'un Streptocoque en inoculant en même temps des cultures ou simplement des produits toxiques solubles d'autres microbes, le *Micrococcus prodigiosus*, le *Proteus vulgaris*, le *Bacille typhique*. Le *Colibacille* est un excellent agent d'exaltation. C'est la raison pour laquelle les infections par le *Streptocoque pyogène* sont si dangereuses chez l'homme lorsque ce microbe se trouve en compagnie d'espèces saprophytes qui se développent avec lui, comme je l'ai observé pour le *Bacillus Zopfii* et le *Proteus vulgaris* dans des cas de phlegmons diffus à terminaison rapidement mortelle (4).

IMMUNITÉ ET SÉROTHÉRAPIE

Roger (5) le premier a conféré l'immunité à des lapins en leur injectant, à plusieurs reprises, des bouillons de culture portés à 120°; nous avons vu qu'une telle température détruit les produits toxiques présents dans les cultures et y laisse subsister une substance à propriétés vaccinantes. Marmorek (6) préfère se servir de cultures vivantes dont il faut user à doses très minimes d'abord; l'immunité obtenue de cette manière atteint un bien plus haut degré. Et encore, l'immunité ainsi produite n'est pas absolue; elle est suffisante contre une inoculation de Streptocoque d'une certaine activité, mais ne résiste pas à un microbe virulent.

En immunisant de grands animaux, le cheval ou l'âne, à l'égard d'un

(1) Roger, Effets des associations microbiennes (*Soc. de Biol.*, 19 janvier 1889).
(2) Monti, Influenza dei prodotti tossici sulla restituzione della virulenza ai microparassiti attenuati (*Acc. dei Lincei*, II, 1889, n° 7).
(3) Vincent, Étude sur les résultats de l'association du Streptocoque et du Bacille typhique (*Ann. de l'Inst. Pasteur*, VII, 1893, p. 141).
(4) *In* Janot, De la pathogénie du phlegmon diffus. Thèse de Nancy, 1888.
(5) Roger, Le Streptocoque (*Soc. de Biol.*, 26 février et 30 mars 1895).
(6) Marmorek, *loc. cit.*

Streptocoque très virulent, Roger et Marmorek ont obtenu un *sérum antistreptococcique* qui donne des résultats satisfaisants chez l'homme dans le traitement de certaines affections à Streptocoques. Les résultats sont souvent inconstants, probablement à cause de cette grande variabilité du microbe qui a abouti à l'établissement de races diverses dont certaines des propriétés biologiques diffèrent, nous l'avons vu, et qui ne se comporteraient pas de la même manière à l'égard de produits défavorables à leur pullulation ou antitoxiques, et aussi à cause de l'activité relativement faible de la toxine employée. Les méthodes nouvelles, permettant d'obtenir des toxines plus actives, peuvent procurer un sérum plus actif.

Le sérum de Marmorek est obtenu avec un Streptocoque isolé d'une angine et amené à une très grande virulence, comme il a été dit page 465. Le cheval est immunisé à l'aide de cultures en bouillon-ascite, injectées sous la peau à doses progressivement croissantes, en commençant par 1 centimètre cube au plus et faisant une nouvelle injection à dose double ou triple, quand toute réaction est terminée. Après un temps assez long de traitement, huit à douze mois, et l'emploi de fortes doses de cultures, 50 à 100 centimètres cubes, sans que la réaction produite soit trop intense, l'animal peut être considéré comme suffisamment immunisé. La récolte du sérum ne doit se faire qu'un mois après la dernière inoculation.

Ce sérum n'a pas d'action bactéricide sur le Streptocoque qui y cultive aussi bien que dans du sérum normal. Il est nettement antitoxique; mélangé à une toxine bien active, en proportion de trois ou quatre parties pour une partie de toxine, il annule complètement l'action de la toxine. Il est préventif et curatif, surtout à l'égard des Streptocoques à virulence habituelle, moins à l'égard de ceux qui possèdent une virulence très élevée. Il n'agglutine que faiblement et irrégulièrement. Il est très employé chez l'homme dans le traitement des affections à Streptocoques. Les résultats ne sont pas constants; toutefois, son emploi semble devoir être toujours conseillé en pareil cas.

Le sérum d'Aronson est obtenu d'une façon très semblable, avec un Streptocoque à virulence très exaltée, tuant la souris à la dose d'un centième de millionième de centimètre cube, et cultivé en bouillon glucosé. Il paraît être beaucoup plus agglutinant que le précédent.

A l'infection par chacune des variétés du *Streptocoque pyogène*, il faudrait peut-être opposer un sérum provenant d'animaux immunisés à l'égard de cette race elle-même. La méthode de Denys (1) et Van de Velde, consistant à immuniser des chevaux avec des mélanges de Streptocoques de diverses provenances, devant donner un *sérum polyvalent*, n'a pas encore fait suffisamment ses preuves (2). Les sérums antistreptococciques de Berne, de Vienne, de Hœchst sont aussi polyvalents.

En partant de cette idée de sérum polyvalent et sur l'inégalité ou même le manque d'action d'un sérum obtenu avec une race donnée à

(1) Denys, Compte rendu des travaux exécutés sur le Streptocoque pyogène à l'Institut de bactériologie de l'Université de Louvain (*Centralbl. für Bakt.*, XXIV, 1898, p. 685).

(2) Van de Velde, Le sérum antistreptococcique polyvalent (*Ann. de la Soc. médico-chirurgicale d'Anvers*, avril 1905).

l'égard de l'infection par des races différentes, Moser (1) a cherché à obtenir un sérum spécialement actif sur le Streptocoque du sang des scarlatineux, que certains regardent comme le véritable agent de la scarlatine. Il a immunisé des chevaux à l'aide de cultures vivantes, en bouillon, d'un mélange d'une vingtaine de Streptocoques qu'il a isolés du sang d'enfants scarlatineux. Pour éviter tous changements dans les propriétés biologiques, il a rejeté toute exaltation de virulence par passages dans les animaux. Avec des doses élevées de sérum, de 30 à 180 centimètres cubes pour une injection, et l'injection était souvent répétée, il aurait obtenu de bons résultats thérapeutiques. Par contre, le sérum de Marmorek, employé comparativement, n'aurait rien donné de satisfaisant.

Bonome et Viola (2) disent avoir obtenu, à l'aide des courants à haute fréquence, la transformation de la toxine des cultures en une antitoxine identique à celle contenue dans le sérum antistreptococcique. Ces résultats n'ont pas été confirmés.

HABITAT ET RÔLE ÉTIOLOGIQUE

Le *Streptocoque pyogène* paraît être extrêmement répandu dans la nature. Certaines de ses particularités en rendent cependant très souvent la recherche et l'identification difficiles, tout spécialement la perte très rapide de la virulence, qui pourrait, plus que toute autre propriété, conduire à une détermination exacte. Eiselsberg (3) l'a, le premier, signalé dans l'air; en exposant des plaques de gélatine dans des salles d'hôpital, il l'a obtenu plusieurs fois; des plaques placées à peu de distance d'érysipélateux lui ont montré des colonies de ce microbe développées autour de petits fragments d'épiderme déposés par l'air. Il est assez commun dans l'eau de rivière ou de puits; c'est une des espèces qui peuvent végéter dans les milieux phéniqués employés pour la recherche du *Bacille typhique* ou du *Colibacille*. J'y ai rencontré les formes troublant et ne troublant pas le bouillon, donnant sur pomme de terre une petite culture blanche polycyclique ou ne donnant pas de culture apparente. Ces Streptocoques de l'eau ne m'ont jamais montré de virulence pour le cobaye ; Landmann (4) dit avoir isolé d'une eau de puits un Streptocoque tuant la souris en cinq ou huit jours à la dose de trois dixièmes de centimètre cube. Tissier et Martelly le signalent dans la putréfaction de la viande.

Chez l'homme sain, le *Streptocoque pyogène* a été trouvé sur la peau, dans la bouche, dans les fosses nasales, dans le vagin, dans le contenu intestinal. Toutefois ces microbes n'ont montré que bien rarement de la virulence. Le *Streptococcus septopyæmicus* que Biondi (5) a isolé

(1) Moser, *Wiener klin. Wochenschr.*, 9 octobre 1902.
(2) Bonome et Viola, Ueber die Produktion der Streptococcus Antitoxine mittelst Electricität (*Centralbl. für Bakt.*, XIX, 1896, p. 849).
(3) Eiselsberg, Nachweiss von Erysipe kokken in der Luft chirurgischer Krankenzimmer (*Langenbeck's Arch.*, XXXV, 1887, p. 1).
(4) Landmann, Ueber das Vorkommen virulenter Streptokokken im Trinkwasser (*Deutsche med. Wochenschr.*, 189).
(5) Biondi, Die pathogene Microorganismen des Speichels (*Zeitschr. für Hygiene*, II, p. 194).

de la salive chez l'homme ne peut pas être distingué du *Streptocoque pyogène*.

C'est un agent pathogène des plus important pour l'homme. Il a la propriété de déterminer des affections souvent très dissemblables, suivant le point par lequel il peut attaquer l'organisme, suivant aussi le degré et la modalité de la virulence qu'il possède. On ne peut que citer les principales de ces manifestations morbides. On le trouve dans nombre d'abcès, de phlegmons, d'ostéomyélites, dans l'érysipèle, dans certaines septicémies, particulièrement dans la septicémie puerpérale, où, d'après Widal (1), il est l'agent infectieux de beaucoup le plus commun, dans la phlegmatia alba dolens des accouchées ; très souvent il est la cause de l'infection purulente chirurgicale. Il est très commun dans les angines, où il est souvent le seul agent pathogène à incriminer, et produit des fausses membranes aussi dangereuses que celles de la diphtérie ; il est l'agent de certaines pneumonies, de bien des pleurésies purulentes ; ou bien il occasionne des méningites purulentes, des myélites, des endocardites, des péricardites, péritonites, métrites, salpingites, néphrites, etc. De plus, souvent il vient compliquer par sa présence un grand nombre d'autres affections microbiennes, tuberculose, pneumonie, fièvre typhoïde, grippe, fièvres éruptives, aggravant presque toujours considérablement la maladie, produisant des infections secondaires redoutables. On sait que lorsqu'il accompagne le *Bacille de Lœffler* dans la diphtérie le pronostic est souvent assombri ; ce qui est particulièrement intéressant ici, c'est qu'il favorise alors le passage du Bacille dans le sang qui ne s'observerait que lorsqu'il y a association du Streptocoque (2). On l'a signalé dans le sang de malades atteints de scarlatine et l'on a même voulu lui faire jouer un rôle capital dans la transmission de cette affection. On l'a rencontré dans le contenu des pustules de vaccine, où il ne joue non plus probablement qu'un rôle secondaire. Pour Marmorek (3), tous les Streptocoques pathogènes pour l'homme appartiendraient à un même type spécifique.

Il joue également un très grand rôle en pathologie animale, dans des conditions semblables à celles où il agit chez l'homme ; il semble surtout fréquent dans les processus similaires des bovidés.

L'anasarque du cheval, d'après Lignières, serait déterminée par un Streptocoque identique à celui de Marmorek. Le *Streptocoque de la gourme* en est bien voisin.

Très répandu dans le milieu extérieur, à la surface de l'organisme sain, il peut y pénétrer dès que l'occasion favorable se présente. Comme il perd très vite sa virulence, il doit alors, pour agir, récupérer rapidement sa puissance nocive d'une manière tout à fait inconnue jusqu'ici.

RECHERCHE ET DIAGNOSTIC

Les préparations microscopiques faites avec le pus, le sang, les sérosités, les coupes de tissus, le font d'ordinaire facilement recon-

(1) Widal, Étude sur l'infection puerpérale, la phlegmatia alba dolens et l'érysipèle. Thèse de Paris, 1889.

(2) Braun et Thiry, Septicémie diphtérique *Gaz. des hôp.*, 2, 4 et 9 mai 1899).

(3) Marmorek, L'unité des Streptocoques pathogènes pour l'homme (*Ann. de l'Inst. Pasteur*, XVI, 1902, p. 172).

naître après coloration au violet, à la thionine phéniquée et emploi de la méthode de Gram.

L'inoculation directe à la souris ou, mieux, au lapin de ses produits pathologiques est le meilleur moyen de s'assurer de son degré exact de virulence; il est préférable de faire d'abord une culture dans un mélange de bouillon et de sérum liquide à parties égales et d'inoculer après vingt-quatre heures.

Les cultures diverses, s'obtenant facilement, donnent aussi d'excellentes indications; mais il faut se rappeler qu'elles ne renseignent pas, ou seulement d'une façon imparfaite, sur la nocivité exacte du microbe isolé. Le diagnostic du Streptocoque est souvent une opération délicate.

Sérodiagnostic. — La réaction d'agglutination et la réaction sérothérapique ne donnent jusqu'ici que des résultats fort inconstants, dus certainement à l'extrême variabilité du *Streptocoque pyogène.* On retrouve ici les mêmes raisons qui déterminent la grande inégalité dans l'action thérapeutique des sérums antistreptococciques. Le sérum de Moser a une action agglutinante manifeste sur les Streptocoques isolés du sang de scarlatineux et aucun effet sur ceux d'autre provenance. En général, l'agglutination ne s'obtiendrait, pour chaque variété de Streptocoque, qu'avec le sérum d'immunisation correspondant (1).

Les divers sérums ne possèdent la propriété agglutinante que d'une façon très irrégulière. Le sérum des malades atteints d'affections streptococciques n'est généralement pas agglutinant.

MICROCOCCUS PASTEURI Sternberg.

(*Pneumocoque, Pneumococcus de Fraenkel, Diplococcus pneumoniæ. Micrococcus lanceolatus.*)

Atlas de microbiologie, pl. XIII.

Pasteur, Roux et Chamberland ont décrit, en 1881 (2), un Microcoque trouvé dans le sang de lapins auxquels ils avaient injecté de la salive d'un enfant mort de rage. L'effet produit fut une septicémie mortelle en trente-six heures; le sang de tous les organes renfermait des Bactéries rondes en grand nombre. Ces expérimentateurs obtinrent les mêmes résultats en injectant à des lapins de l'expectoration de bronchopneumoniques. Un des caractères les plus apparents a été dès lors signalé, la présence d'une capsule entourant la Bactérie *comme d'une auréole.*

Peu de temps après, Sternberg (3), sans connaître les recherches de Pasteur sur ce point, arrivait à des conclusions identiques et décrivait quelques-unes des particularités de culture de l'espèce, à laquelle il a attribué plus tard le nom qui doit lui être conservé, vu son droit de priorité, *Micrococcus Pasteuri.* Cet observateur admettait alors son identité avec le *Pneumobacille* de Friedlaender, qui s'en distingue par bien des caractères (4).

(1) Meyer, *Deutsche med. Wochenschr.*, 16 octobre 1902.
(2) Pasteur, Roux et Chamberland, *Bull. de l'Acad. de méd.*, 25 janvier et 22 mars 1881.
(3) Sternberg, *Amer. Journ. of Med. sc.*, avril 1881.
(4) Sternberg, The Pneumoniacoccus of Friedlaender, Micrococcus Pasteuri (*Amer. Journ. of Med. sc.*, July 1885).

Jusqu'alors, cette espèce ne paraissait occasionner qu'une maladie purement expérimentale, n'ayant d'analogue dans aucune des affections connues de l'homme ou des animaux. Après Friedlaender (1), qui le confondait avec le *Pneumobacille*, Talamon (2) l'avait cependant signalée dans les crachats des pneumoniques, dans l'exsudat du poumon, obtenu par ponction pendant la vie ou pris à l'autopsie, et une fois dans le sang d'un malade peu de temps avant la mort. Il en avait obtenu des cultures dans des bouillons et déterminé chez des lapins, par injection de liquide de culture, des pneumonies véritables, accompagnées souvent de pleurésie et de péricardite. Les animaux meurent d'habitude du quatrième au cinquième jour, après avoir atteint des températures élevées, jusqu'à 41°,8; certains d'entre eux ont résisté. Talamon ne mentionne pas la présence de la capsule, mais insiste sur la forme ovale, à petite extrémité pointue, des coccus qu'il dit être lancéolés, ressemblant à des grains de blé.

Ce sont surtout les recherches de A. Fraenkel (3) qui ont contribué à mettre en évidence son rôle pathogène important. Le caractère qui l'avait frappé d'abord était son action sur l'organisme du lapin, d'où le nom qu'il lui avait donné, *Micrococcus der Sputumsepticaemie* (Microcoque de la septicémie salivaire); ce n'est que plus tard qu'il est arrivé à le considérer comme la cause de la pneumonie chez l'homme. Actuellement, pour tous (4), c'est l'agent essentiel de la pneumonie infectieuse; le *Pneumobacille de Friedlaender* ne joue, lorsqu'il s'y rencontre, qu'un rôle de saprophyte, pouvant envahir le poumon malade ou mort. Tout comme son congénère, il ne se localise pas toujours dans les poumons, mais pénètre dans la circulation générale et provoque des inflammations métastatiques, qui affectent surtout les grandes séreuses, d'où ces pleurésies, péricardites, endocardites, méningites, péritonites même, consécutives à la pneumonie, pouvant même se déclarer d'emblée, sans que la Bactérie ait porté d'avance son action sur le poumon (5).

Ortmann et Santer (6) ont rencontré exclusivement le Pneumocoque, doué d'une très grande virulence, chez plusieurs sujets atteints de pneumonie, dans le pus de différents abcès des parties molles et dans le pus d'une arthrite suppurée. Picqué et Veillon (7) n'ont rencontré que ce même microbe dans le pus d'une arthrite purulente du genou, consécutive à une pneumonie.

D'après les recherches de Foa et Bordoni (8), cette espèce serait

(1) Friedlaender, Ueber die Schizomyceten bei der acuten fibrinösen Pneumonie (*Virchow's Arch.*, Bd LXXXVII, 1882).

(2) Talamon, *Soc. anat.*, 1883, et *Soc. de Biol.*, 21 mai 1884.

(3) Fraenkel, Die genuine Pneumonie (*Congrès de méd. int. de Berlin*, 1884). — Bacteriologische Mittheilung (*Deutsche med. Wochenschr.*, 1885, et *Zeitschr. für klin. Med.*, X, p. 401). — Weitere Beiträge zur Lehre von den Micrococcen der genuinen fibrinösen Pneumonie (*Zeitschr. für klin. Med.*, X, Heft 5-6; XI, Heft 5-6).

(4) Weichselbaum, Ueber die Aetiologie der acuten Lungen-und Rippenfellentzündungen (*Wiener med. Jahrb.*, 1886, p. 483). — Gamaléia, Étiologie de la pneumonie fibrineuse (*Ann. de l'Inst. Pasteur*, 1888, p. 440).

(5) Netter, De la méningite due au Pneumocoque avec ou sans pneumonie (*Arch. gén. de méd.*, avril et juillet 1887).

(6) Ortmann et Santer, *Virchow's Arch. für path. Anat.*, 1890.

(7) Picqué et Veillon, *Arch. de méd. expér.*, janvier 1891.

(8) Foa et Bordoni, *Sem. méd.*, 1887, p. 431.

même, à l'exclusion du *Méningocoque*, la cause constante et exclusive de la méningite cérébro-spinale épidémique; on verra plus loin le rôle important qu'il joue dans cette affection.

Gram (1) l'a trouvé dans le sang des pneumoniques.

Depuis, il a été reconnu que ce *Micrococcus* existait dans la bouche à l'état normal. Netter (2) l'a isolé en employant la méthode primitive de Pasteur, l'injection de salive dans la jugulaire de lapins. D'après lui, il n'existerait pas toujours dans la bouche, mais peut disparaître à un moment donné, pour reparaître plus tard. On le retrouve pendant une période très longue dans la salive des anciens pneumoniques, mais, fait bizarre, il est inactif pendant les deux semaines qui suivent la défervescence, puis récupère sa virulence, qu'il garde alors longtemps. Vignal (3) et Biondi (4) l'ont isolé directement de la salive, à l'aide des cultures sur plaques. L'influence pathogène du microbe est tenue en échec, chez l'homme sain, par l'activité des éléments phagocytaires du poumon.

MORPHOLOGIE

Caractères microscopiques. — Ces caractères varient suivant qu'on examine le microbe provenant de l'organisme ou de culture en milieux artificiels. Dans l'organisme, il présente un aspect plus spécial. Talamon et Fraenkel ont été les premiers à signaler la forme particulière des éléments de cette espèce. Ce sont des

Fig. 207. — Exsudat pneumonique. Les capsules sont colorées d'après Netter).

Fig. 208. — Diplocoques des crachats de pneumonie (obj. 12, homog., oc. 4, Vérick).

coccus (fig. 207) ovales, allongés, en forme de grain de blé ou d'orge (Talamon), ou en forme de lancette (Fraenkel), de flamme de bougie (Netter). Ils sont rarement isolés, bien plus souvent en diplocoques ou en courtes chaînes de quatre à six éléments et toujours immobiles. Chez les individus associés en diplocoques, les pointes de deux élé-

(1) Gram, Ueber die isolirte Färbung der Schizomyceten in Schnitt-und Trocken-Præparate (*Fortschr. der Med.*, 1884).

(2) Netter, De l'endocardite végétante ulcéreuse d'origine pneumonique (*Arch. de physiol.*, VIII, 15 août 1886, p. 106). — De la présence du microbe de la pneumonie dans la bouche des sujets sains (*Bull. méd.*, 1er mai 1887). — Du microbe de la pneumonie dans la salive (*Soc. de Biol.*, 1888). — Et *passim* dans les *C. R. de la Soc. de Biol.*, 1888 et 1889. — Voy. aussi : Le Pneumocoque, revue critique (*Arch. de méd. expér.*, 1890).

(3) Vignal, Recherches sur l'action des microorganismes de la bouche sur quelques substances alimentaires (*Arch. de physiol.*, 1887, p. 200).

(4) Biondi, Die pathogenen Microorganismen der Speichels (*Zeitschr. für Hygiene*, II, 2e p., p. 194).

ments sont tournées toutes deux vers l'extérieur. Dans les cultures sur milieux liquides, ses éléments restent souvent associés en chaînettes plus ou moins longues (fig. 209). La forme et les dimensions des coccus sont du reste assez variables ; on en trouve de sphériques, de 0,5 μ de diamètre, et d'autres plus ovoïdes ayant en longueur de 1 μ à 1,5 μ sur 1 μ de large. Dans certaines cultures, la longueur pourrait même l'emporter plus que d'habitude sur la largeur ; on aurait alors comme de courts bâtonnets. De là vient que certains auteurs décrivent cette espèce comme appartenant au genre *Bacillus*.

Fig. 209. — Pus de méningite suppurée, compliquant une pneumonie double avec *Pneumocoques* (Vérick, obj. 12, homog., oc. 4).

Les coccus sont entourés d'une zone gélatineuse épaisse, d'une sorte de capsule, très évidente dans les préparations de crachats pneumoniques ou l'exsudat de méningite. D'après Pane (1), cette capsule serait une sorte de dégénérescence de la partie externe de la

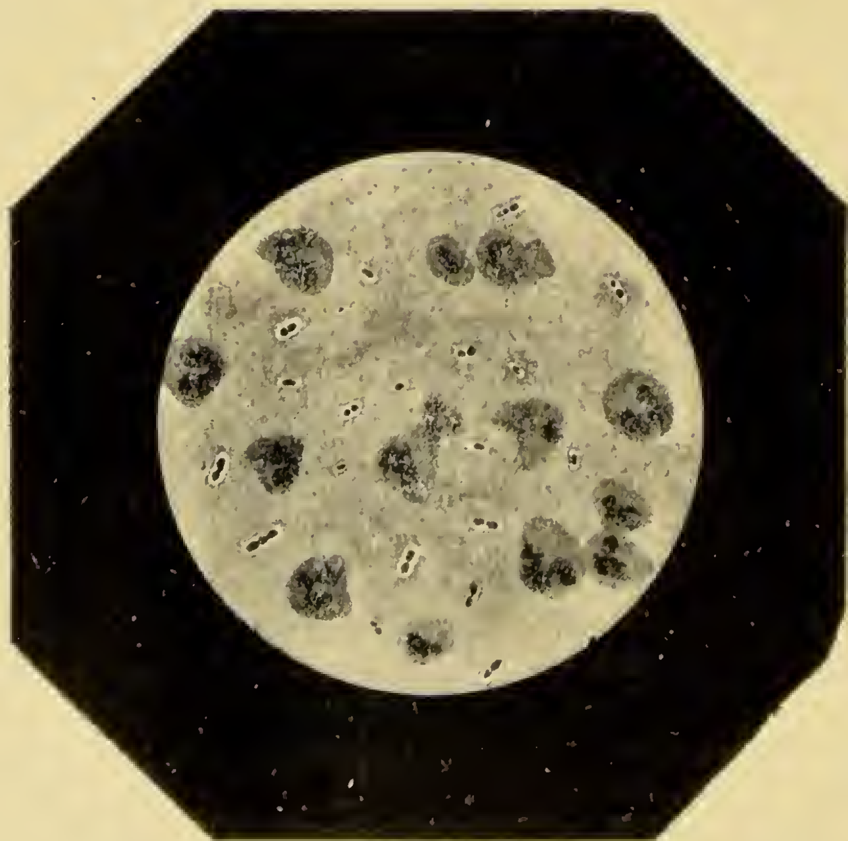


Fig. 210. — Pneumocoques dans le pus d'une péritonite suppurée. 1000/1.

membrane. La capsule pourrait faire défaut à un stade très avancé de la pneumonie. Elle peut du reste manquer sans raison apparente.

(1) Pane, Ueber die Genesis der Kapseln des Pneumococcus (*Centralbl. für Bakt.*, XXIV, 1898, p. 289).

Dans les cultures, sauf dans celles en milieux albumineux, surtout milieux au sérum et au sang, cette capsule disparaît pour reparaître dans le sang des animaux inoculés avec elles. Les éléments des cultures ont une forme lancéolée moins marquée et sont plus souvent sphériques, en diplocoques ou disposés en chaînes souvent plus longues, principalement dans les bouillons, ce qui les a fait nommer par Gamaléia *Streptococcus lanceolatus Pasteuri*.

Coloration. — Le *Pneumocoque* se colore très bien aux diverses couleurs d'aniline. Le bleu de Lœffler donne particulièrement de bons résultats.

Avec les violets d'aniline, *il reste coloré* par la méthode de Gram,

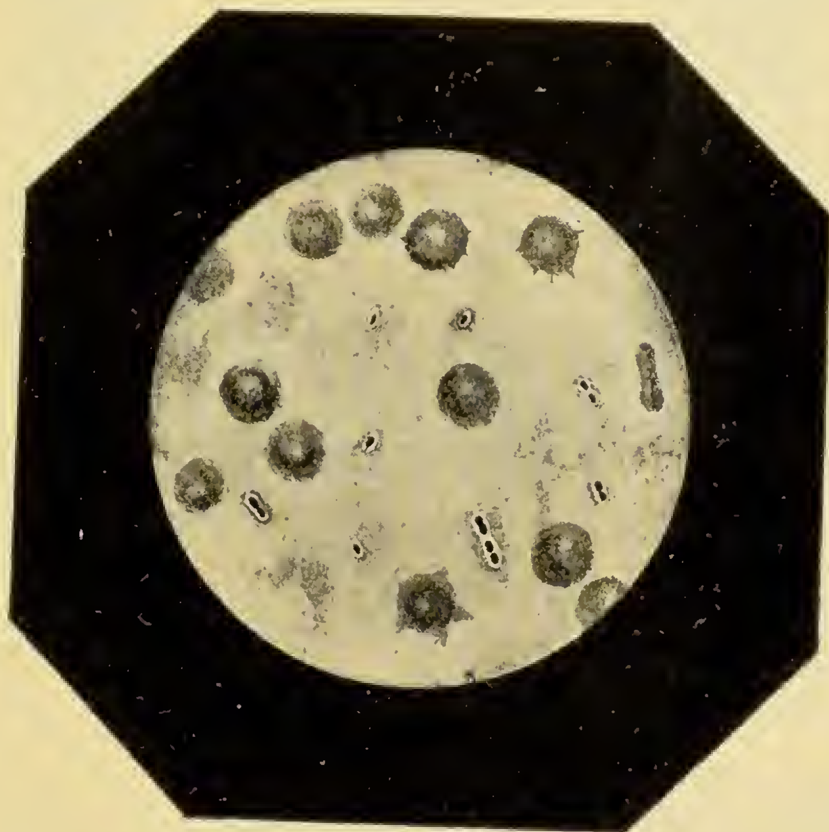


Fig. 211. — Pneumocoques dans le sang d'une souris inoculée avec des crachats de pneumonie. 1000/1.

ce qui le différencie facilement du *Pneumobacille de Friedlaender*; on peut ainsi obtenir, avec l'éosine, de belles doubles colorations dans le sang ou le pus.

Les procédés à mettre en œuvre pour obtenir la coloration des capsules ont été exposés page 398.

Cultures. — Les cultures ne se développent bien qu'à partir de 24°; l'optimum de température est vers 27°, le développement s'arrête à 42°. La présence d'oxygène, quoique favorable, n'est pas d'une nécessité absolue; c'est un anaérobie facultatif, qui peut se passer d'air, au moins dans de larges limites. Une légère alcalinité du milieu est une condition essentielle pour réussir les cultures. On arrive à les conserver plus longtemps en ajoutant de la craie qui neutralise l'acide produit.

Cultures dans le bouillon. — Cette espèce se cultive bien dans le bouillon, à l'étuve; le liquide se trouble à peine, on observe tout au plus un très léger nuage dans les vieilles cultures et un minime dépôt grenu. Le microbe s'y trouve en chaînettes plus ou moins longues (fig. 212).

Les bouillons additionnés de sérum, de liquide d'ascite ou de produits similaires, donnent des cultures plus abondantes.

Cultures sur plaques de gélatine. — En cultures sur plaques, avec

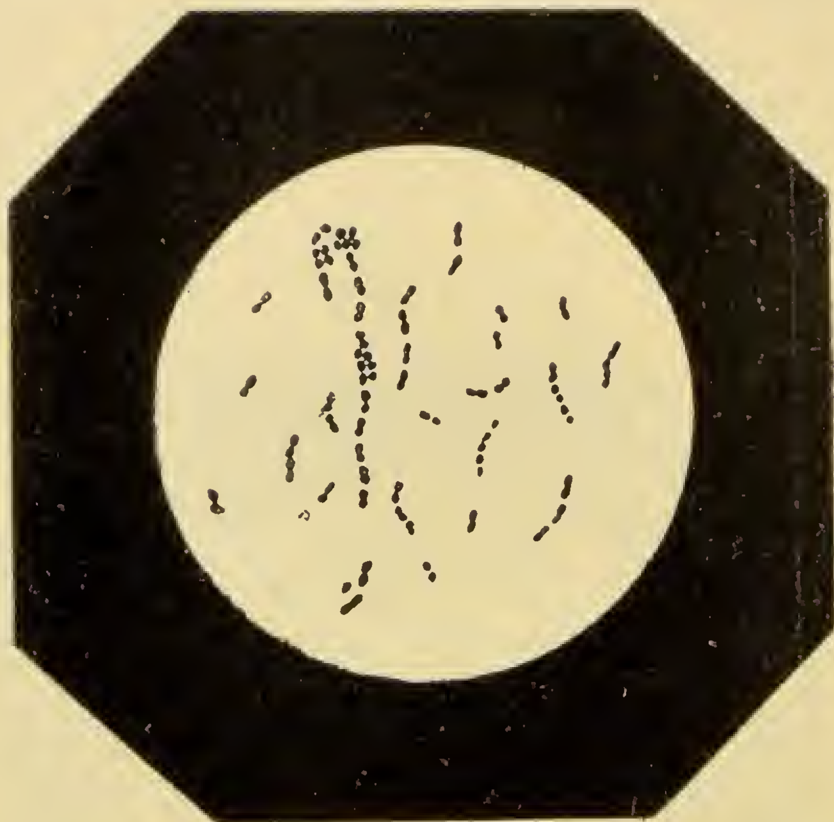


Fig. 212. — Pneumocoques en chaînettes d'une culture dans le bouillon. 1000/1.

de la gélatine à 15 p. 100 qui se maintient solide à 24°, au bout de trente-six heures on observe dans la gelée de petits points grisâtres, dont les supérieurs arrivent à la surface et s'y étendent en petites taches rondes, d'un blanc grisâtre, qui croissent très lentement et n'atteignent jamais une grandeur moyenne. La gélatine *n'est pas liquéfiée*.

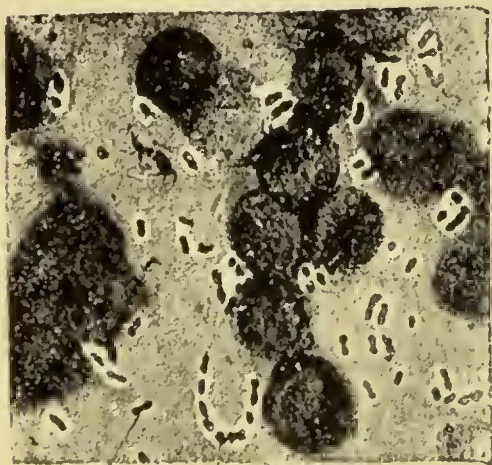


Fig. 213. — Pneumocoques dans la salive (d'après Biondi).

Cultures sur gélatine. — En *piqûre* dans un tube de gélatine, il se forme une culture *en clou*, peu forte, avec une mince tige blanche, formée de petites colonies sphériques, et une tête très peu développée, non bombée ; après quelques générations, la forme de clou disparaît et le développement est moins abondant.

Cultures sur gélose. — Sur gélose à 35°, on obtient de petites colonies brillantes hyalines, peu saillantes, difficiles à apercevoir, ressemblant, comme le dit Fraenkel, à des gouttes de rosée.

Cultures sur sérum. — Dans le *sérum liquide*, la culture a les mêmes caractères que dans le bouillon. D'après Mosny (1), le sérum du sang de lapin, recueilli aseptiquement, non soumis à un chauffage préalable, constitue le meilleur milieu de culture pour le Pneumocoque, de beau-

(1) Mosny, Sur la culture du Pneumocoque (*Soc. de Biol.*, 21 décembre 1895).

coup préférable au sérum de chien, de bœuf, de cheval, de mouton ou d'âne. Le sérum humain, surtout d'adulte, ne paraît pas un bon milieu. En général, l'âge paraît ici influencer sur les qualités du sérum, en plus ou en moins suivant l'espèce (1); le sérum d'animaux jeunes, surtout pour le lapin, paraît en général mieux convenir.

Le sérum de lapin jeune constitue le *milieu de choix* pour la culture du Pneumocoque. Il se trouble rapidement à 37° et montre déjà après vingt-quatre heures un dépôt notable. On y reconnaît de nombreux diplocoques encapsulés. C'est le véritable milieu de diagnostic. Le sérum de lapin adulte donne une culture moins abondante ; les microbes y ont des capsules moins nettes. Les sérums d'autres animaux jeunes, cobaye, poule, sont également très favorables. On peut ainsi reconnaître la présence du Pneumocoque, même quand l'inoculation à la souris n'a rien donné.

Sur *sérum coagulé*, le Pneumocoque donne une mince culture muqueuse, presque transparente. Les colonies isolées ressemblent à celles obtenues sur gélose.

Cultures dans le sang. — Le *sang défibriné* est un très bon milieu pour ce microbe, d'après Gilbert et Fournier (2). Il en est de même du sang rendu incoagulable par certains artifices indiqués précédemment (p. 233) ; aussi du *sang gélosé* préparé en mélangeant à de la gélose ordinaire, maintenue fondue à 45°, un tiers de sang d'animaux d'expérience habituels, mélange qu'on laisse se solidifier en tubes inclinés.

Sur sang défibriné coagulé, les cultures s'entourent d'une auréole verdâtre, puis jaune-chamois (Gilbert et Fournier). Dans ces milieux, le *Pneumocoque* conserve longtemps sa vitalité et sa virulence.

Cultures sur pomme de terre. — On n'observe pas de développement.

Cultures dans le lait. — Le lait est coagulé d'ordinaire ; le fait paraît dû à la production d'acide, probablement d'acide formique.

PROPRIÉTÉS BIOLOGIQUES

Vitalité. — C'est une espèce délicate. Il périt en dix minutes à 56° (Sternberg), vite à 60°, très vite vers 65°-70°. Il est tué rapidement par le sublimé au millième et l'acide phénique à 2 p. 100

La dessiccation, dans les conditions ordinaires, le détruit facilement ; mais, protégé par un vernis albumineux, comme dans du sang, du pus ou des crachats desséchés, il reste vivant pendant trois ou quatre mois en conservant ses propriétés. Le fait est probablement dû au manque de pénétration de l'oxygène ; on le conserve, en effet, bien plus longtemps actif en cultures anaérobies.

La vitalité persiste plus dans les milieux liquides, surtout dans les milieux au sang, comme il a été dit ci-dessus ; on l'y retrouve vivant après des mois. Sur milieux solides, surtout gélose et gélatine, les cultures sont délicates ; elles meurent souvent au bout de quatre à cinq jours.

(1) Bezançon et Griffon, Recherches sur le mode de développement et la vitalité du Pneumocoque dans les divers sérums (*Soc. de Biol.*, 19 février 1898).

(2) Gilbert et Fournier, La culture du Pneumocoque dans le sang défibriné (*Soc. de Biol.*, 11 janvier 1896).

Virulence. — Elle est des plus variable suivant la provenance du microbe.

Dans les cultures, la virulence disparaît tôt, même en réeusemençant rapidement. Une température un peu élevée l'affaiblit vite ; les cultures sont tout à fait inoffensives lorsqu'elles ont été maintenues à 42° pendant vingt-quatre heures. Les deuxièmes cultures sont déjà bien moins virulentes que les premières. Les cultures dans le vide gardent leur virulence plus longtemps, pendant trois semaines environ. On peut arriver à une restitution de virulence en inoculant à un lapin simultanément de la culture de Pneumocoque et du bouillon de culture filtré de *Proteus vulgaris.*

Dans les milieux au sang, qui sont de véritables milieux de conservation, le Pneumocoque reste pendant des mois vivant et virulent sans transplantation (Besançon). Il suffit, pour s'en convaincre, de repiquer dans du sérum de lapin jeune et d'inoculer la culture après vingt-quatre heures à la souris.

Les passages successifs par le lapin, en injection intraveineuse et surtout intrapéritonéale à la dose de quelques gouttes de sang, exaltent notablement la virulence du microbe.

Dans les crachats, toutefois, la virulence persiste longtemps, plusieurs mois sans même présenter d'atténuation (1) ; elle résiste même à une dessiccation prolongée. Le froid est un bon moyen de conservation. Elle se conserve assez longtemps dans le sang de lapin conservé en pipettes pleines, scellées ; il en est de même dans le sang défibriné ou incoagulable, dans le liquide d'ascite ; Lemière (2) l'a vu persister quatre mois dans le pus d'une pleurésie purulente conservé pendant quatre mois.

Produits formés dans les cultures. — Nous avons déjà signalé la présence d'acide dans les cultures ; ce serait surtout de l'acide formique (3). L'acide se forme aux dépens des sucres. Toutes les matières sucrées ne sont pas attaquées par le Pneumocoque ; l'inuline, en particulier, n'est pas modifiée, caractère pouvant servir pour le diagnostic.

Les substances toxiques des cultures ne sont pas connues ; elles doivent être bien peu stables à cause de la disparition rapide de l'activité. Klemperer signale cependant une toxine que le sulfate d'ammoniaque et l'alcool précipiteraient de bouillons de culture filtrés. Mais cette toxine est peu active. Issaeff (4) a obtenu une toxine assez active du sang et exsudats pleuraux et péritonéaux de lapins ayant succombé aux inoculations de Pneumocoques à virulence exaltée.

En cultivant le Pneumocoque sur de la matière cérébrale d'homme ou

(1) Ottolenghi, Ueber die Widerstandsfähigkeit des Diplococcus lanceolatus gegen Austroknung in den Sputa (*Centralbl. für Bakt.*, XXV, 1899, p. 120). — Spolverini, Sulla resistenza del virus pneumonico negli sputi (*Ann. d'Igiene sperimentale*, 1899, p. 103).

(2) Lemière, Vitalité et virulence du Pneumocoque dans les exsudats pathologiques conservés en dehors de l'organisme (*Journ. des sc. méd. de Lille*, 13 mai 1899).

(3) Wurtz et Mosny, De la réaction acide des cultures du Pneumocoque (*Soc. de Biol.*, 27 janvier 1894, p. 71).

(4) Issaeff, Contribution à l'étude de l'immunité aiguë contre le Pneumocoque (*Ann. de l'Inst. Pasteur*, VII, 1893, p. 260).

de lapin, Carnot et Fournier (1) ont obtenu une toxine très active, très hémorragipare et provoquant surtout des désordres musculaires intenses, myosites et myocardites. L'injection intrapulmonaire de quelques gouttes de cette toxine détermine un noyau d'hépatisation rouge avec coagulum fibrineux.

Bonardi (2), Griffiths (3), puis Andreini (4) ont reconnu la présence, dans les cultures et produits pneumoniques, d'une base alcaloïdique toxique à laquelle ils pensent pouvoir rapporter l'activité des microbes.

INOCULATION EXPÉRIMENTALE

L'isolement du microbe se fait facilement en inoculant des crachats à la souris; après deux passages, on le trouve pur dans le sang. Du produit de cultures jeunes, inoculé à des lapins, des souris ou des cobayes, les fait mourir en peu de temps, de vingt-quatre à quarante-huit heures d'habitude; toutefois, les cobayes résistent souvent.

La réceptivité des différentes espèces animales à la septicémie pneumonique est très variable. Les souris sont les plus sensibles; après, viennent, en ordre de sensibilité décroissante, les lapins, les rats, les cobayes, les chiens. Les pigeons sont tout à fait réfractaires.

La souris, blanche ou grise, meurt toujours sans exception après l'inoculation sous la peau. Il suffit de quelques gouttes d'une culture virulente pour la faire périr d'une septicémie aiguë (*pneumococcie généralisée*) en un délai de douze ou vingt-quatre heures; ici l'infection générale est de règle; tandis que chez l'homme elle est l'exception. On trouve peu de désordres à l'autopsie: un peu d'œdème au point d'inoculation, une rate hypertrophiée, le sang noir et de très nombreux microbes capsulés dans le sang et les organes.

Chez les lapins, les symptômes sont bien voisins. La rate est grande, foncée, dure. Le virus y produit fréquemment des pneumonies ou des pleurésies séro-fibrineuses. Les cultures stérilisées à 120° produisent par inoculation une grosse tumeur qui ne présente aucune tendance à la suppuration.

Les rats, blancs et gris, meurent aussi très régulièrement de la septicémie spéciale; mais, pour arriver à ce résultat, il faut employer des doses plus fortes que pour les animaux précédents.

Les cobayes paraissent résister souvent à l'infection, ou ne présentent qu'une petite réaction locale. C'est un terrain infidèle pour ce virus.

Le mouton ne succombe qu'aux injections de doses très fortes. L'inoculation intrapulmonaire est suivie d'une pneumonie fibrineuse typique, presque toujours mortelle.

Les chiens sont encore plus réfractaires. Il faut, pour les tuer, inoculer des doses massives. L'inoculation intrapulmonaire développe une

(1) Carnot et Fournier. Lésions cardiaques et musculaires provoquées par la toxine pneumococcique (*Soc. de Biol.*, 10 février 1900). — Recherches sur le Pneumocoque et ses toxines (*Arch. de méd. expér.*, XII, 1900, p. 357).

(2) Bonardi, Prima ricerche sur la chimica del diplococco capsulato di Fraenkel (*Rivista generale di clinica medica*, 1889, nos 7 et 8).

(3) Griffiths, *C. R. de l'Acad. des sc.*, CXIII, p. 656.

(4) Andreini, Beiträge zur Studium der basischen Produkte des Diplococcus pneumoniae (*Centralbl. für Bakt.*, XXIII, 1898, p. 678 et 736).

véritable pneumonie franche qui guérit presque toujours après avoir passé par les phases d'hépatisation rouge et d'hépatisation grise, en tout semblables à ce qui se passe chez l'homme.

Les oiseaux sont tout à fait réfractaires. Strouse (1) a montré que, chez le pigeon, l'immunité était due à la température élevée du corps; en l'abaissant à l'aide d'antithermiques, l'animal devient aussi sensible que la souris.

Gamaléia classe l'homme parmi les animaux résistant au virus pneumonique, d'après la mortalité pneumonique faible (10,8 p. 100), la réaction locale étendue qu'il présente dans la forme de l'inflammation des poumons et la rareté des microbes dans son sang. Pour lui, la pneumonie n'est pas une infection générale, se localisant de prédilection dans le poumon, mais bien « la réaction locale à l'endroit de l'inoculation virulente ».

Pour observer l'infection chez les animaux, il suffit d'ordinaire de quelques gouttes de bouillon de première culture, injectées sous la peau. Il se produit dans ce cas une véritable septicémie, la *septicémie pneumococcique*; on trouve de nombreux *Pneumocoques* capsulés dans le sang et dans tous les organes; la rate surtout est dure et peut avoir doublé de volume. Il ne paraît pas y avoir de préférence pour les manifestations pulmonaires; on n'observe pas ou peu de réaction au point d'inoculation. Talamon a cependant obtenu de véritables pneumonies en injectant directement, dans les poumons de lapins, du sang contenant de ces *Micrococcus*.

La virulence s'accroît d'ordinaire par passages à travers l'organisme animal, surtout chez la souris et le lapin.

La virulence des cultures doit toutefois être pour beaucoup dans les résultats obtenus. Les accidents d'infection générale, grave et rapidement mortelle, de septicémie pneumococcique, ne surviennent qu'à la suite d'inoculation d'un microbe bien virulent. Avec un Pneumocoque qui n'est pas très virulent, on n'observe guère qu'une lésion locale, puis de l'amaigrissement, le développement de péricardite, de pleurésie, parfois d'arthrites, suppurées ou non, enfin la mort par cachexie à échéance plus ou moins éloignée.

D'après Foa et Bordoni (*loc. cit.*), l'inoculation de cultures atténuées ne produit qu'une inflammation localisée, une sorte de pseudo-tuberculose, après injection dans le poumon, et confère aux moutons l'immunité pour les cultures virulentes. Les lapins inoculés avec des virus très atténués acquièrent l'immunité.

IMMUNITÉ ET SÉROTHÉRAPIE

Il est possible de vacciner les animaux contre l'infection pneumococcique. Fraenkel et Emmerich y sont parvenus les premiers en injectant des dilutions de cultures virulentes. Netter, Foa et Scabia (2) conseillent d'employer des cultures à virulence atténuée. Issaeff (3) a obtenu facile-

(1) Strouse, Experimental studies on Pneumococcus infections (*Journ. of exper. med.*, 1909, XI, n° 5).

(2) Foa et Scabia, Sulla immunita e sulla terapie delle pneumonite (*Gazz. med. di Torino*, 1892).

(3) Issaeff, *loc. cit.*, p. 476.

ment l'immunisation de lapins en se servant de cultures stérilisées par filtration ou par addition de chloroforme et chauffées à 60° ou 65°. Le liquide est injecté dans le sang de ces animaux à doses successivement croissantes de 10 à 50 centimètres cubes. Il se produit une réaction plus ou moins forte, de la fièvre, une notable diminution de poids. Souvent une seule injection de 10 centimètres cubes de toxine suffit pour rendre le lapin réfractaire à un haut degré à l'infection pneumococcique. G. et F. Klemperer (1) ont également obtenu l'immunisation d'animaux par l'injection de crachats pneumococciques, d'exsudats à pneumocoques stérilisés, de sérum sanguin de pneumoniques; Mosny (2) est arrivé à un résultat analogue avec des macérations filtrées d'organes de lapins morts de septicémie pneumococcique. Mennes (3), en partant d'un microbe à virulence très exaltée par de nombreux passages chez le lapin, obtient une toxine à l'aide de laquelle il a pu immuniser des lapins, des chèvres, des chevaux. Le sérum de ces derniers animaux serait nettement préventif et curatif à l'égard des infections à Pneumocoques.

D'après Klemperer, le sérum des animaux vaccinés serait nettement antitoxique; il contiendrait une *antitoxine pneumococcique*; c'est aussi l'avis de Wassermann (4), qui croit que l'infection pneumonique provoque chez les animaux une irritation de la moelle osseuse qui devient le siège de formation de l'antitoxine. Issaeff pense qu'il n'est pas antitoxique, mais seulement bactéricide; cependant, *in vitro*, il n'exerce aucune action bactéricide sur le microbe qui s'y cultive, bien qu'assez mal.

Il faut toutefois, ici, ne pas trop se hâter de vouloir généraliser à l'homme ce que l'on peut observer chez les animaux d'expériences, surtout chez le lapin, l'évolution de la maladie présentant des différences capitales; l'infection pneumococcique est, en effet, chez le lapin et d'autres animaux, un processus général, tandis qu'elle reste chez l'homme un processus essentiellement local.

Le sérum d'animaux non sensibles au *Pneumocoque* ne montre aucune efficacité, malgré leur inoculation à forte dose avec des cultures; d'après Foa et Scabia, il hâterait, au contraire, la mort des lapins inoculés. C'est donc surtout le sérum de lapins vaccinés qui peut être employé dans un but thérapeutique (5).

G. et F. Klemperer disent en avoir obtenu de bons résultats, à la dose de 6 à 10 centimètres cubes chez des pneumoniques.

Bouchard, Roger, Charrin, Maragliano ont employé avec succès, chez le lapin, contre l'infection pneumococcique expérimentale, et chez l'homme atteint de pneumonie, le sérum d'hommes pneumoniques pris au début de la convalescence.

(1) Klemperer, Versuche über Immunisierung und Heilung bei der Pneumokokken-infection (*Berlin klin. Wochenschr.*, 1891, p. 833).

(2) Mosny, Recherches expérimentales sur la vaccination contre l'infection pneumococcique et sur sa guérison (*Arch. de méd. expér.*, 1892, p. 195).

(3) Mennes, Das Antipneumokokken-sérum und der Mechanismus der Immunität des Kaninchens gegen den Pneumokokken (*Zeitschr. für Hygiene*, XXV, 1897, p. 413).

(4) Wassermann, Pneumokokkenschutzstoffe (*Deutsche med. Wochenschr.*, 1899, p. 141).

(5) Roger, Application du sérum sanguin au traitement des maladies (*Congrès de méd. de Nancy*, 1896).

Righi (1) a signalé une guérison d'enfant atteint de méningite aiguë pneumococcique à la suite de l'injection de 1 centimètre cube de sérum provenant d'un convalescent de même affection.

HABITAT ET RÔLE ÉTIOLOGIQUE

Nous l'avons vu très fréquent chez l'homme, où il paraît être pour ainsi dire un habitant normal de la bouche. Il se trouve aussi normalement dans les fosses nasales, souvent dans le mucus des bronches, constamment aussi sur les amygdales (Bezançon et Griffon) (2). Il vit là en saprophyte, souvent même dépourvu de toute virulence, mais probablement prêt à profiter de toute occasion en pouvant récupérer facilement et très vite son activité.

A l'état pathologique, c'est l'agent le plus habituel de la pneumonie; on le trouve en abondance dans les crachats, le suc pulmonaire et même le sang des pneumoniques (93 p. 100), où son abondance paraît souvent être en rapport avec la gravité de l'affection (3). Il pourrait même occasionner seul la pneumonie suppurée (4). Mais il peut en outre, seul ou en associations avec d'autres microbes, déterminer un grand nombre d'autres affections pathologiques. Il y a des stomatites, des parotidites, des otites, des conjonctivites, des méningites, des myélites, des pleurésies, des arthrites, des endocardites, des ostéomyélites (5), des affections des voies génito-urinaires, de l'intestin, des infections puerpérales (6), dues au Pneumocoque. Il peut en outre se généraliser et déterminer de véritables septicémies. Wolf (7) le donne comme un des agents habituels de la méningite cérébro-spinale, plus fréquent même que le *Méningocoque* de Weichselbaum. Neufeld (8) signale un véritable érysipèle à Pneumocoques. Il peut déterminer seul la formation de fausses membranes croupales et se trouve souvent associé au *Bacille de Lœffler* dans la diphtérie; les fausses membranes à Pneumocoques sont d'ordinaire épaisses, consistantes. Il peut occasionner des infections secondaires dans le cours d'autres maladies, la grippe par exemple.

D'après Marchoux (9), il serait un des microbes pouvant produire cette forme de méningo-encéphalite désignée en Afrique sous le nom de *Maladie du sommeil*; d'autres microbes ont été incriminés, entre autres un Bacille spécial, assez long, produisant des spores, occasionnant par ses toxines une encéphalite et une myélite diffuses (10). Il est prouvé

(1) Righi, La seroterapia nella meningite (*La Riforma medica*, III, 1894, p. 566).

(2) Bezançon et Griffon, *Gaz. des hôp.*, 1898, n° 45, p. 413.

(3) Silvestrini et Sertoli, *Settim. Med.*, 13 mai 1899.

(4) Kieffer, Étude bactériologique de la pneumonie lobaire suppurée. Thèse de Paris, 1901.

(5) Blecher, Sur un cas d'ostéomyélite à Pneumocoque (*Sem. méd.*, 1899, n° 3, p. 23).

(6) Schuhl et Thiry, Infection puerpérale à Pneumocoques (*Revue méd. de l'Est*, 1897). — Hergott, Infection puerpérale à Pneumocoques (*Soc. de méd. de Nancy*, 26 mai 1897).

(7) Wolf, Ein Beitrag zur Aetiologie der circumskripten Meningitis (*Berlin. klin. Wochenschr.*, 1897, n° 10).

(8) Neufeld, *Zeitschr. für Hygiene*, XXXVI.

(9) Marchoux, Rôle du Pneumocoque dans la pathologie et dans la pathogénie de la maladie du sommeil (*Ann. de l'Inst. Pasteur*, XIII, 1899, p. 193).

(10) Kuborn, La maladie du sommeil (*Acad. de méd. de Belgique*, 26 octobre 1901). — Van der Corput, Sur la pathogénie de la maladie du sommeil (*ibid.*, 28 déc. 1901).

aujourd'hui que l'agent de cette affection est un Flagellé, le *Trypanosoma gambiense*, que transmettent des Insectes piqueurs, en particulier des Glossines.

En dehors du corps de l'homme, la répartition de ce microbe est peu connue dans les différents milieux naturels, où il doit cependant abonder.

Emmerich (1) a isolé des cultures de Pneumocoque de la poussière située sous le plancher d'une salle où se trouvaient des pneumoniques; il aurait obtenu des résultats certains chez les souris, à la suite d'inoculation de ces cultures. Uffelmann (2) dit avoir obtenu des cultures caractéristiques de Pneumocoques de l'air d'une cave; il ne donne aucune preuve expérimentale à l'appui. Netter (3), en inoculant dans le péritoine de jeunes cobayes de la poussière recueillie dans les salles d'hôpitaux, a obtenu, à plusieurs reprises, des péritonites et des pleurésies à Pneumocoques.

Les souris, si sensibles à l'action de ces microbes, joueraient peut-être, dit Gamaléia, un rôle actif dans la propagation des affections pneumoniques, particulièrement dans la production de ces véritables endémies de pneumonie maligne, localisées souvent dans des maisons déterminées, où elles persistent d'une façon très tenace.

RECHERCHE ET DIAGNOSTIC

On peut avoir à rechercher le *Pneumocoque* dans les crachats, dans le pus, dans le sang, dans des exsudats divers, dans des sucs organiques ou dans les tissus eux-mêmes. En général, le pus à Pneumocoques est épais, souvent grumeleux, riche en globules.

Pour la constatation du Pneumocoque, les procédés de culture ordinaires ne donnent que des résultats très irréguliers, sauf la culture dans le sérum de lapin jeune, qui est un véritable milieu de diagnostic (p. 475). Hiss (4) propose, dans ce but, le milieu suivant (*Milieu de Hiss*) : une partie de sérum de bœuf est mélangée à deux ou trois parties d'eau distillée et une partie d'une solution à 5 p. 100 de teinture de tournesol neutre très pure; on chauffe quelques minutes à l'ébullition. On ajoute 1 p. 100 d'inuline, répartit en tubes qu'on tyndallise à 70°, trois jours de suite.

Le *Pneumocoque* vrai ne doit pas rougir ce milieu de Hiss et surtout ne pas en produire la coagulation.

Les préparations colorées ou l'inoculation aux animaux sensibles permettent, au contraire, de poser très vite des conclusions positives.

Bezançon et Griffon (5) préfèrent à l'inoculation directe, comme moyen plus sensible, la culture dans le sérum de lapin jeune suivie, au bout de vingt-quatre heures, d'inoculation à la souris.

(1) Emmerich, Pneumoniekokken in der Zwischen-Deckenfüllungs als Ursache einer Pneumonie (*Fortschr. der Med.*, 1884).

(2) Uffelmann, *Berlin. klin. Wochenschr.*, 1887, n° 39, p. 726.

(3) Netter, Présence du Pneumocoque dans les poussières des salles d'hôpitaux (*Soc. de Biol.*, 29 mai 1897).

(4) Hiss, In Studies on the Pneumococcus under the auspices of the medical commission for the Study of acute respiratory diseases of the department of health of the City of New York (*The Journ. of exper. med.*, VII, 1905, p. 401-632).

(5) Bezançon et Griffon, Milieu de diagnostic et milieu de conservation du Pneumocoque (*Soc. de Biol.*, 12 mars 1898).

Dans les préparations, en opérant comme il a été indiqué plus haut, on distingue très facilement les doubles coccus lancéolés, *restant colorés* après traitement par la méthode de Gram, montrant souvent leur capsule transparente qui retient parfois un peu de matière colorante.

L'inoculation aux animaux sensibles est certainement le moyen de recherche le plus sûr. On se sert de lapins ou de souris; Netter prend le lapin; Gamaléia recommande la souris comme l'animal réactif du *Pneumocoque*. On injecte de la salive ou du suc du poumon; l'injection intraveineuse est préférable. L'animal succombe toujours à la septicémie spéciale (*septicémie pneumonique*). Les lésions viscérales sont peu importantes; la rate seule est très hypertrophiée. Le sang et les différents organes renferment des quantités de diplocoques spéciaux qui se montrent, après coloration, entourés de leur auréole.

Comme l'injection intraveineuse de suc pneumonique ou de crachats amène souvent la mort par embolie, que le Pneumocoque est parfois peu abondant dans le sang de l'animal inoculé et peut y être dépourvu de capsules, que par l'injection sous-cutanée à la souris les microbes sont encore plus rares dans le sang, Honl (1) propose l'injection sous-cutanée à l'oreille du lapin, toujours suivie de signes bien particuliers. Au bout de vingt-quatre heures, l'oreille est œdématiée; l'œdème envahit bientôt toute la tête et surtout les parties molles de la mâchoire inférieure. L'animal meurt en deux ou trois jours, quelquefois plus lentement si le Pneumocoque est plus virulent. Dans le liquide qui sort de la région œdématiée, on trouve de nombreux Pneumocoques encapsulés, donnant facilement des cultures pures. Dans les autres affections que la pneumococcie, les crachats n'amènent pas la mort du lapin parce que les Pneumocoques sont trop peu abondants et trop peu virulents pour tuer le lapin par cette voie.

On rencontre fréquemment, dans la bouche surtout, des *Pneumocoques* atypiques, qu'une série de passages dans les milieux au sérum peut ramener au type normal. C'est le cas du *Streptococcus mucosus capsulatus* de Schottmuller qui avait été rapproché à tort du *Streptocoque*. Ces formes atypiques, d'après Park et Williams (2), seraient plus fréquentes dans la bouche des personnes saines que dans celle des pneumoniques.

Il existe du reste entre le *Pneumocoque* et le *Streptocoque* des rapports certains. Ce sont des microbes qui peuvent être considérés, avec l'*Entérocoque* dont il sera question plus loin, comme faisant partie d'un même groupe naturel.

Sérodiagnostic. — Les sérums des pneumoniques, et celui des animaux immunisés contre le Pneumocoque, possèdent des propriétés agglutinantes manifestes vis-à-vis des cultures du microbe. Les amas se forment plus ou moins bien, suivant les cas, avec un microbe récemment retiré d'exsudat pneumonique; on n'obtient souvent rien avec les cultures entretenues depuis quelque temps dans les laboratoires (3). La

(1) Honl, Experimentelles Pneumokokkenœdem und dessen diagnostische Bedeutung (*Centralbl. für Bakt.*, XXIII, 1898, p. 274).

(2) Park et Williams, In Studies on the Pneumococcus, de la Commission américaine, citées précédemment (p. 481).

(3) Bezançon et Griffon, Pouvoir agglutinatif du sérum dans les infections expérimentales et humaines à Pneumocoques (*Soc. de Biol.*, 5 et 19 juin 1897). — Id., Du

réaction peut se produire ici alors que le microbe se trouve dans le sang ; dès la défervescence, elle diminue et arrive à disparaître rapidement. On ne l'observe pas avec tous les Pneumocoques ; on peut ne l'observer qu'avec le microbe isolé du malade lui-même.

Pour mettre nettement en évidence la réaction d'agglutination, Bezançon et Griffon (1) recommandent la culture du *Pneumocoque* dans le sérum sanguin du malade lui-même. On peut prendre du sang avec une seringue stérilisée, dans une veine superficielle, ou utiliser celui qui est fourni par l'application d'une ou deux ventouses scarifiées. Dans ce dernier cas, on fait l'asepsie de la peau, comme d'habitude, et on flambe la capsule de la ventouse. Le sang recueilli est mis à coaguler dans un vase stérilisé. Il suffit de 1 ou 2 centimètres cubes de sérum, que l'on répartit dans deux ou trois petits tubes stérilisés. Ces tubes sont ensemencés avec une culture de *Pneumocoque* et mis à l'étuve à 37°. On les examine après quinze à seize heures. Dans le cas d'infection pneumococcique, ou bien le sérum est clair et l'on voit au fond un dépôt formé d'amas irréguliers de microbes ; ou bien le liquide est trouble, mais montre, au microscope, des amas formés de microbes et de chaînettes agglutinés. L'agglutination est toujours plus nette avec un microbe isolé de la bouche du même malade qu'avec un microbe de laboratoire ou un provenant d'autres individus ; elle peut souvent ne réussir que dans le premier cas. L'agglutination ne se produit jamais avec un sérum normal d'homme, de lapin ou de chien.

La réaction à l'antitoxine ne donne pas de résultats nets.

MICROCOCCUS ENTERITIS.

(*Streptococcus enteritis d'Escherich, Entérocoque de Thiercelin.*)

Les formes de Streptocoques décrites par Escherich (2) dans l'intestin des nourrissons, probablement les Streptocoques de la bouche de Marot (p. 462), et le microbe décrit par Thiercelin (3) comme espèce commensale de l'intestin de l'homme, pouvant à l'occasion devenir pathogène, doivent bien probablement être rapportés à un même type microbien doué d'un grand polymorphisme, protéiforme, comme le dit Jouhaud (4) dans une excellente étude.

séro-diagnostic des affections à Pneumocoques (*Congrès franç. de méd. de Montpellier*, 1898).

(1) Bezançon et Griffon, Étude de la réaction agglutinante du sérum dans les infections expérimentales et humaine à Pneumocoques (*Ann. de l'Inst. Pasteur*, XIV, 1900, p. 448). — Griffon, L'agglutination du Pneumocoque. Thèse de Paris, 1903.

(2) Escherich, Die Darmbacterien der Saüglings und ihre Beziehungen zur Physiologie der Verdauung (*Fortschr. der Med.*, 1885). — Id., Die Bedeutung der Bakterien in der Aetiologie der Magendarmerkrankungen der Saüglinge (*Deutsche med. Wochenschr.*, 1898, nos 40 et 41). — Id., Ueber Streptokokken Enteritis im Säuglingsalter (*Jahrb. für Kinderheilkunde*, XLIX, 1899, p. 137).

(3) Thiercelin, Sur un Diplocoque saprophyte de l'intestin susceptible de devenir pathogène (*Soc. de Biol.*, 15 avril 1899). — Id., Morphologie et mode de reproduction de l'Entérocoque (*Ibid*,, 24 juin 1899).

(4) Jouhaud, Caractères biologiques de l'Entérocoque. Thèse de Paris, 1903.

MORPHOLOGIE

Dans les selles normales, où il se rencontre souvent en grand nombre, il se présente le plus souvent sous la forme de diplocoques de volume variable, à grains arrondis ou lancéolés, comme le *Pneumocoque*, souvent irréguliers, entourés même parfois d'une petite capsule; d'autres fois, les diplocoques sont associés en chaînettes donnant des formes de Streptocoques, le plus souvent courbées ou ondulées; certains éléments peuvent même donner de petits bâtonnets. Dans certaines affections intestinales, il est beaucoup plus abondant dans les selles, où il présente du reste les mêmes variations de forme.

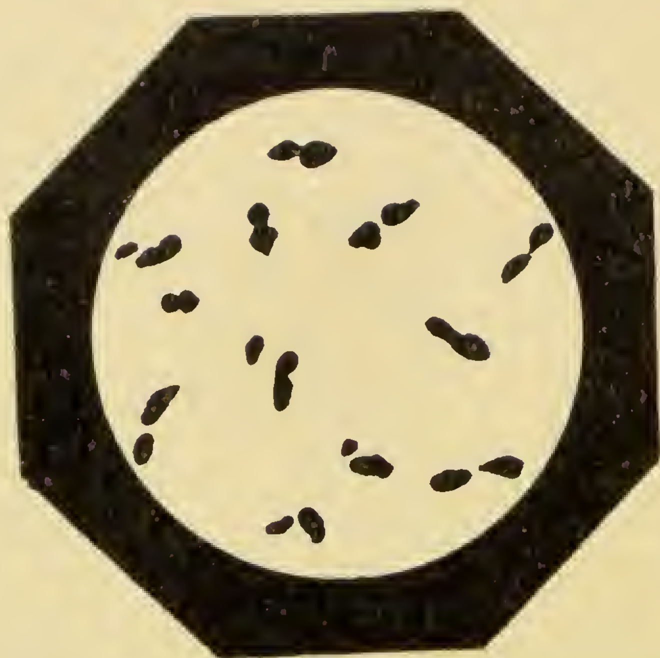


Fig. 214. — Forme typique de l'Entérocoque (d'après Jouhaud). 1250/1.

Dans les cultures ordinaires, on trouve surtout la forme en diplo-



Fig. 215. — Formes variées de l'Entérocoque (d'après Jouhaud). 1250/1.

coques (fig. 214), avec ou sans auréole, puis des chaînettes de longueur moyenne (fig. 215).

Dans les vieilles cultures, on trouve des formes très variées, des éléments géants, arrondis, en massues, filamenteux, donnant des sortes de bourgeons ou d'excroissances. Dans les cultures additionnées de substances chimiques, surtout les cultures bichromatées à 0gr,05 p. 100 de bouillon, on observe la production d'éléments de dégénérescence de formes très variées, surtout allongés, même filamenteux (fig. 216).

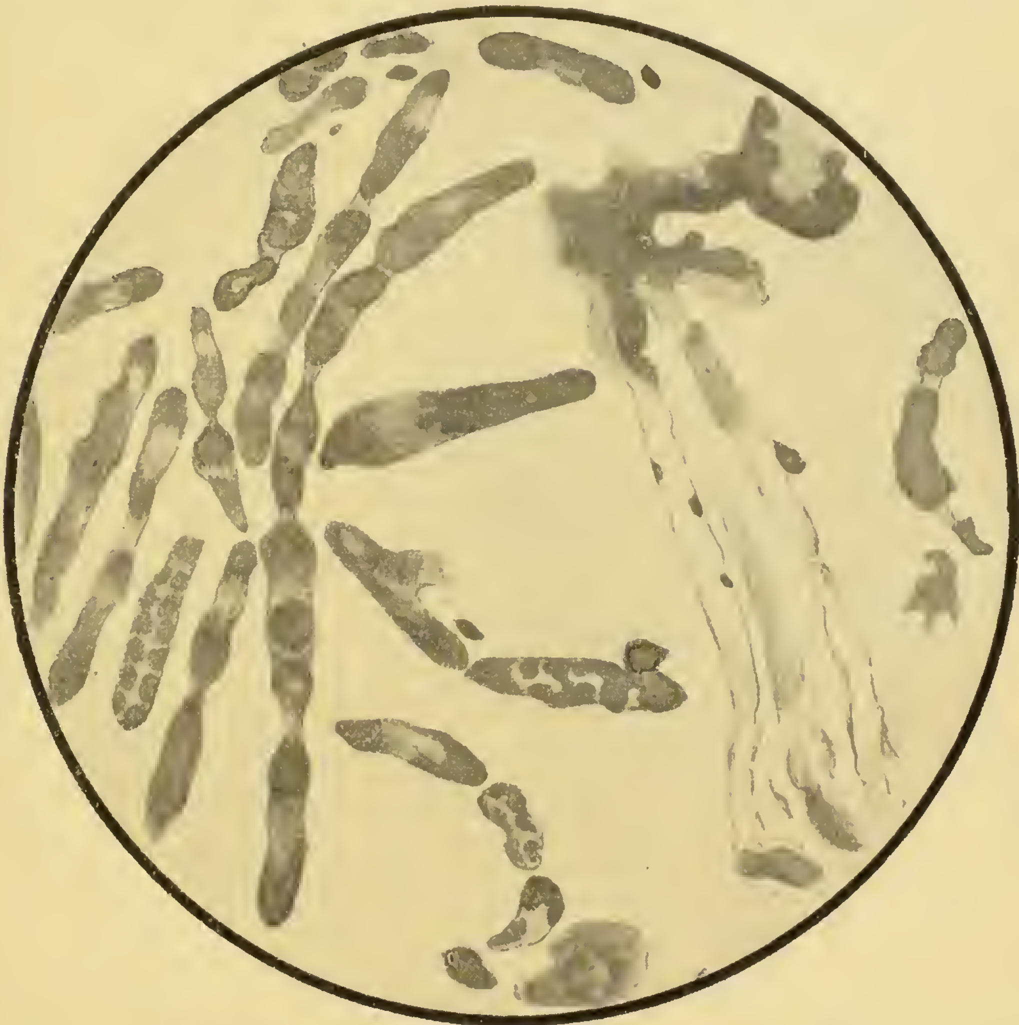


Fig. 216. — Entérocoque. Formes de dégénérescence de cultures en bouillon bichromaté (d'après Jouhaud). 2340/1.

D'après Jouhaud, en culture dans un sac de collodion plongé dans le bouillon, surtout si ce bouillon a été ensemencé avec du *Bacille typhique* ou contient des toxines de ce dernier microbe, on trouve des chaînettes très longues, à éléments affectant nettement la disposition diplococcique (fig. 217).

D'après Thiercelin, il pourrait se former des spores dans les éléments : c'est très douteux.

L'*Entérocoque* se colore facilement aux couleurs d'aniline et *reste coloré* par la méthode de Gram. Les formes anormales se colorent mal ou pas du tout.

Cultures. — L'*Entérocoque* s'accommode de très peu de matière nutritive; il végète même dans l'eau ordinaire stérilisée et dans les solutions minérales ordinaires.

Les cultures s'obtiennent difficilement en partant des selles normales,

facilement au contraire avec les selles pathologiques qui contiennent ce microbe en très grande abondance. Il suffit d'ensemencer une parcelle de produit dans le bouillon et d'isoler ensuite en stries sur gélose. Thiercelin (1) recommande, pour les selles normales, de diluer une parcelle des matières fécales dans un tube de bouillon de culture et de filtrer sur un double filtre de papier, l'entonnoir et les filtres étant stérilisés. On ensemence ensuite des tubes de gélose avec le liquide; l'Entérocoque presque seul a traversé le filtre. Ou bien de faire une culture en bouillon, dans le vide, avec une parcelle de matière fécale;



Fig. 217. — Culture d'Entérocoque en sac de collodion, soumise à l'action des produits sécrétés par le Bacille typhique (d'après Jouhaud). 530/1.

l'Entérocoque, poussant plus rapidement que les autres en anaérobie, s'obtient facilement sur gélose au bout de vingt-quatre heures.

Les cultures sont souvent variables comme aspect, même quand elles sont faites dans des conditions en apparence identiques, même ensemencées avec un même produit.

Le microbe se cultive en aérobie et en anaérobie. Les cultures anaérobies paraissent plus résistantes.

La température optima paraît comprise entre 38° et 40°; le microbe pousse très bien encore à 43°, mais plus à 46°.

(1) Thiercelin, Procédés faciles pour isoler l'Entérocoque des selles normales (*Soc. de Biol.*, 26 juillet 1902).

Culture dans le bouillon. — Le liquide se trouble uniformément et donne après quelques jours un dépôt blanchâtre muqueux ; c'est ce qui arrive avec les bouillons bien nutritifs, le bouillon Martin par exemple. Dans les bouillons pauvres, le milieu reste limpide et il se forme, sur les parois et au fond du tube, un léger piqueté floconneux qui rappelle l'aspect donné fréquemment par le *Streptocoque pyogène*.

Culture sur gélose. — Il s'y forme de petites colonies rondes, punctiformes, transparentes (fig. 218), ressemblant aux cultures du *Pneumocoque* sur ce même milieu, plus opaques cependant et possédant un relief plus marqué. Les bords en sont même parfois irréguliers et sinueux.

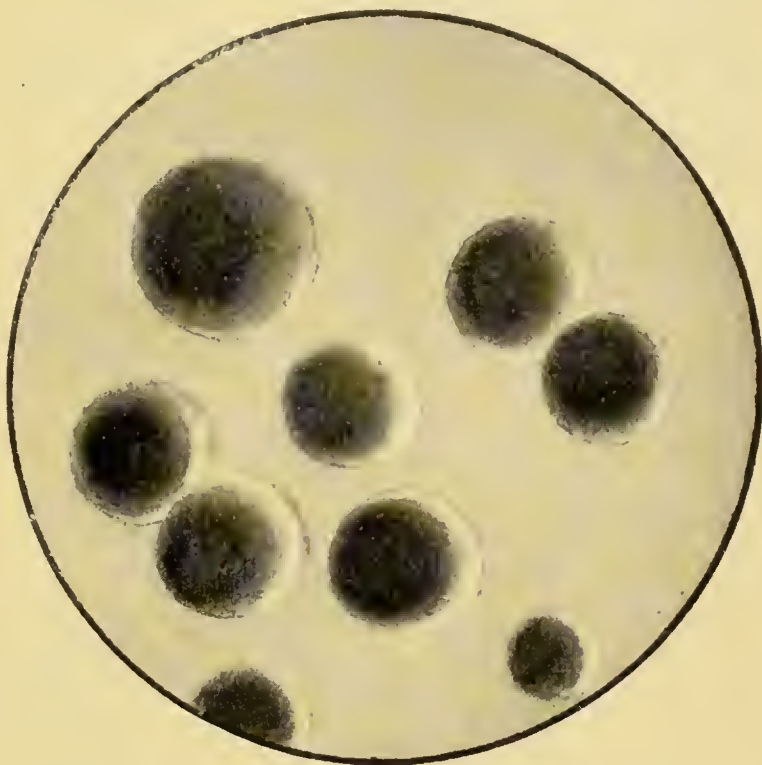


Fig. 218. — Colonies d'Entérocoque sur gélose (d'après Jouhaud). 40/1.

Culture sur gélatine. — Les colonies ne diffèrent guère de celles obtenues sur gélose ; elles se développent plus lentement à cause de la différence de température, mais sont toujours assez marquées. Le milieu n'est jamais liquéfié.

En piqûre, il se fait une ligne moniliforme le long du canal et une colonie un peu plus grande et plus opaque à la surface.

En strie, on obtient des colonies isolées, ou une bande brillante, à demi transparente.

Culture en sérum liquide. — La culture est minime ; il se forme un dépôt peu abondant montrant des diplocoques entourés parfois d'une petite auréole ou d'une mince capsule.

Culture sur sérum coagulé. — Le développement est très peu marqué. Le milieu n'est jamais liquéfié.

Culture sur pomme de terre. — L'Entérocoque y pousse très mal et forme à peine une légère couche vernissée.

Culture dans le lait. — Le développement s'y fait très bien. La coagulation apparaît généralement en vingt-quatre heures, mais elle est inconstante.

Aucune des cultures ne produit de gaz ou d'odeur.

L'*Entérocoque* se cultive très bien dans les bouillons de culture filtrés du *Bacille typhique*, du *Colibacille*, du *Staphylocoque doré*.

PROPRIÉTÉS BIOLOGIQUES

La vitalité est en général très grande. Les cultures donnent des résultats positifs après un temps très long de conservation.

Une température de 60°, maintenue pendant quinze ou vingt minutes,

suffit pour les stériliser. La dessiccation n'agit que très lentement.

La résistance aux antiseptiques paraît assez grande. Le microbe pousse bien dans le bouillon phéniqué à 1gr,25 p. 1000 qui sert pour l'isolement du *Colibacille*. Rosenthal (1) dit même qu'on peut arriver graduellement à le faire se développer dans un bouillon qui contient jusqu'à 6 p. 1000 d'acide phénique. L'aldéhyde formique paraît être l'antiseptique le plus actif contre ce microbe ; à la dose de 1 p. 60000, il n'en empêche cependant pas la culture.

L'action sur les différents sucres paraît nulle. D'après Coyon (2), cependant, il se produirait de l'acide acétique, de l'acide lactique et un peu d'alcool.

L'albumine n'est pas attaquée.

Le microbe sécréterait une toxine produisant à la longue des effets cachectisants rappelant l'athrepsie vraie.

INOCULATION EXPÉRIMENTALE

L'Entérocoque n'est pas pathogène pour le cobaye. Il l'est peu pour le lapin qui n'est tué rapidement que par de très fortes doses en injec-

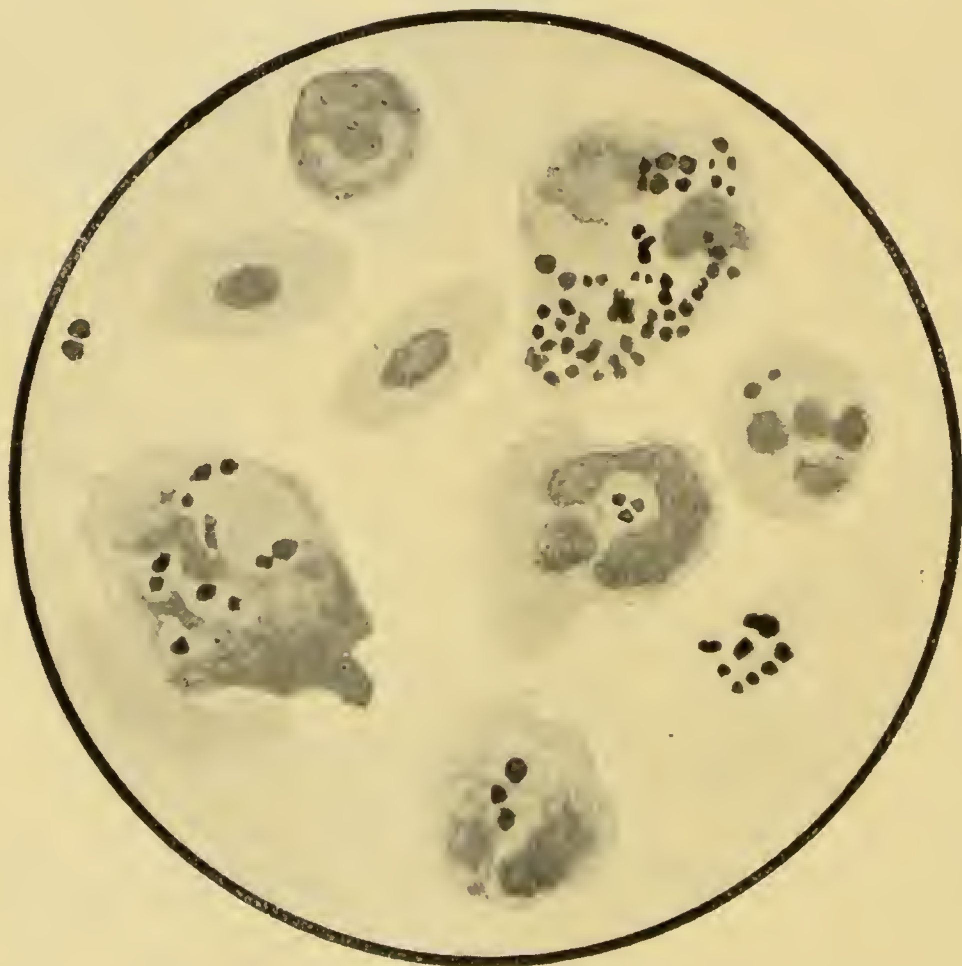


Fig. 219. — Sérosité péritonéale d'une grenouille vingt-quatre heures après l'inoculation (d'après Jouhaud). 1320/1.

tions sous-cutanées : avec des doses moyennes, l'animal se cachectise lentement et meurt après un mois ou deux, ne présentant plus de

(1) Rosenthal. Recherches bactériologiques et cliniques sur quelques cas de bronchopneumonie aiguë. Thèse de Paris, 1900.

(2) Coyon. Flore microbienne de l'estomac. Thèse de Paris, 1900.

microbes dans ses organes. L'élimination se fait rapidement par les reins; l'urine montre très vite de grandes quantités de microbes.

Il est aussi pathogène pour la souris; 1 centimètre cube de culture dans le bouillon, en inoculation sous-cutanée, peut la tuer en vingt-quatre heures. On trouve quelques diplocoques auréolés dans le sang et des matières diarrhéiques dans l'intestin grêle. D'autres fois, elle résiste ou ne présente que des phénomènes locaux. Sacquépée aurait obtenu la mort à la suite d'ingestion.

Chez la grenouille, à la suite de l'inoculation dans le sac lymphatique dorsal, il se produit une phagocytose très intense: certains leucocytes, quelques heures après l'inoculation, sont bourrés de microbes (fig. 219). L'animal résiste et ne succombe qu'avec des doses énormes de culture, ou l'arrêt de l'action phagocytaire par la chloroformisation.

HABITAT ET RÔLE ÉTIOLOGIQUE

Il paraît être un microbe saprophyte, commensal de l'intestin normal qu'il peut habiter dans toute sa longueur, mais susceptible de devenir virulent et de jouer un rôle important en pathologie intestinale, soit comme agent pathogène direct, soit comme agent d'infections secondaires. On doit lui rapporter probablement pas mal d'entérites infectieuses, particulièrement des entérites des nourrissons et des jeunes enfants, des entérites muco-membraneuses de l'enfant ou de l'adulte (1), certains cas d'entérites cholériformes. Lewkowicz (2) et Simonin (3) croient qu'il joue un rôle actif dans beaucoup de dysenteries. Il abonde dans les mucosités glaireuses du contenu intestinal et paraît jouer un rôle dans la production de l'appendicite; peut-être doit-on lui rapporter certains cas d'embarras gastrique (on le rencontre en effet aussi dans l'estomac) et d'ictère infectieux, de cholécystites (Gilbert et Lippmann), d'hépatite suppurée. La grippe pourrait être une forme d'entérococcie. Thiercelin et Rosenthal l'ont rencontré dans le nez, la bouche, le pharynx, sur la peau, dans le vagin, sur la vulve à l'état normal; ils l'ont trouvé, seul, dans le pus de certaines méningites cérébro-spinales épidémiques, dans des bronchites et des bronchopneumonies, probablement grippales (entérococcie pulmonaire). Il peut occasionner une véritable septicémie et se trouver alors dans le sang. Thiercelin le soupçonne d'être un agent de la fièvre puerpérale (4). L'association avec le *Colibacille* paraît favoriser l'action des deux microbes (5). On a signalé des urétrites à Entérocoque (6).

(1) HIRSH, Ein Fall von Streptokokken-Enteritis im Saüglingsalter (*Centralbl. für Bakt.*, XXII, 1897, p. 369). — LIBMANN, Weitere Mittheilungen über die Streptokokken-Enteritis bei Saüglingen (*Ibid.*, p. 376). — SPIEGELBERG, Ein weiterer Beitrag zur Streptokokken-Enteritis im Saüglingsalter (*Ibid.*, XXIV, 1898, p. 49).

(2) LEWKOWICZ, L'Entérocoque comme agent de dysenterie (*Przeglad lekarsky*, 1901, nos 5-7, en polonais).

(3) SIMONIN, Sur la présence et la signification de l'Entérocoque dans les selles dysentériques (*Soc. de Biol.*, 30 mars 1901).

(4) THIERCELIN, L'Entérocoque dans les produits organiques en putréfaction et dans l'infection puerpérale (*Soc. de Biol.*, 1908).

(5) HUTINEL, Entéro-colite aiguë (choléra sec) chez les enfants (*Sem. méd.*, 1899, no 4, p. 25). — DE NOBÉCOURT, Sur la pathogénie des affections gastro-intestinales des jeunes enfants (*Sem. méd.*, 1899, no 22, p. 169, et Thèse de Paris, 1899).

(6) LAVENANT et TRASTOUR, Les urétrites à Entérocoques (*Tribune méd.*, 9 déc. 1905).

Tissier (1) ne l'a jamais rencontré dans les selles normales des enfants nourris au sein ; il est au contraire fréquent dans les selles normales et pathologiques des enfants nourris au biberon. Pour Jouhaud, il jouerait un grand rôle dans l'athrepsie infantile.

Sacquépée (2) considère l'*Entérocoque* comme agent d'intoxication alimentaire. Il l'a rencontré dans du lard salé ayant déterminé une épidémie bénigne de 160 cas. Il existait en abondance dans les selles des malades et possédait une virulence notable, ayant facilement baissé.

Le *Streptocoque*, signalé par Bonome (3) dans la méningite cérébro-spinale est peut-être à rapprocher de l'*Entérocoque*, si ce n'est pas du Pneumocoque.

Tissier et Martelly ont signalé ce microbe dans les putréfactions des viandes. Il pourrait être ce Streptocoque poussant dans les bouillons phéniqués dont j'ai signalé la présence fréquente dans les eaux souillées.

Par bien des caractères, il se rapproche du *Streptocoque pyogène* et du *Pneumocoque*, à tel point qu'on serait tenté de le regarder comme un type intermédiaire entre ces deux microbes. Il présente aussi des ressemblances certaines avec le *Méningocoque*.

MICROCOCCUS TETRAGENUS Gaffky.

(*Tétragène.*)

Atlas de microbiologie, pl. XXI.

Il a été signalé par Koch, qui l'avait trouvé dans le contenu d'une caverne pulmonaire. C'est Gaffky (4) qui lui a donné son nom et a fourni les premiers détails sur sa morphologie.

Fig. 220. — Crachats contenant des *Micrococcus tetragenus* et des *Bacilles de la tuberculose*. 600/1.

Tout à côté de cette première espèce, à considérer comme espèces bien distinctes ou comme variétés, viennent les *Micrococcus tetragenus septicus*, *Micrococcus tetragenus albus* et *Micrococcus tetragenus aureus* décrits par Boutron (5). Le premier, virulent, provenait de crachats de phtisiques. Le second, à cultures blanches, non virulent, a été rencontré dans la

(1) Tissier, Recherches sur la flore intestinale du nourrisson. Thèse de Paris, 1900.

(2) Sacquépée, Intoxications alimentaires à Entérocoques (*Soc. de Biol.*, 19 oct. 1907).

(3) Bonome, Sull'aetiologia della meningite cerebro-spinale epidemica (*Arch. per le sc. med.*, XIII, 1890).

(4) Gaffky, Ueber antiseptische Eigenschaftes der in der Esmarch'schen Klinik als Verband mittel benutzten Torfmulls (*Langenbeck's Arch.*, XXVIII, 1893, p. 495).

(5) Boutron, Recherches sur le *Micrococcus tetragenus septicus* et quelques espèces voisines. Thèse de Paris, 1893.

bouche d'individus sains. Le troisième, non virulent, à cultures jaunâtres, s'est trouvé sur le mamelon et dans le lait de femmes.

On doit peut-être encore placer ici le *Micrococcus tetragenus mobilis ventriculi* de Mendoza (1), qui présente une mobilité bien évidente, et le *Micrococcus tetragenus concentricus* trouvé par Schenk (2) dans les selles. P. Teissier (3) a donné une bonne monographie du *Micrococcus tetragenus*. Le travail de Bosc et Galavielle (4) contient aussi beaucoup de données intéressantes.

MORPHOLOGIE

Les éléments sont des coccus sphériques de 1 μ et plus de diamètre, qui, provenant de l'organisme, se montrent d'habitude réunis par quatre, d'où vient le nom attribué à l'espèce ; dans les cultures âgées, les éléments n'ont souvent que 0,6 μ ou 0,8 μ. Ici, la disposition en tétrades est rare ; on trouve souvent des diplocoques ou des coccus isolés, parfois en chaînettes. L'aspect rappelle un peu celui des *Sarcines*, mais la division ne se fait pas suivant trois directions, comme chez ces dernières. Les tétrades, par leur assemblage, ne donnent jamais des masses cubiques, mais seulement des tablettes, ayant un seul élément dans leur épaisseur, ce qui les distingue des *Sarcines*, fréquentes aussi dans les crachats. Dans les cultures, les éléments sont d'ordinaire isolés ou réunis en amas irréguliers.



Fig. 221. — Formes et aspects divers du Tétragène en cultures (d'après Bosc et Galavielle).

A côté de cette forme en tétrades régulières, que l'on peut considérer comme typique, on rencontre dans les cultures et dans l'organisme des formes des plus variées, des tétrades irrégulières, des triades, des diplocoques, même des coccus isolés ; de plus, la grosseur des éléments présente de grandes variations. La figure 221, empruntée à Bosc et Galavielle, donne de bons exemples de ces différents aspects.

(1) Mendoza, Ueber einen neuen Micrococcus (*Centralbl. für Bakt.*, VI, 1889, p. 566).

(2) Schenk, Micrococcus tetragenus concentricus in Fæces (*Allgem. Wiener med. Zeit.*, 1892, p. 81).

(3) P. Teissier, Contribution à l'étude du Tétragène (*Arch. de méd. expér.*, 1896, p. 14).

(4) Bosc et Galavielle, Recherches sur le *Micrococcus tetragenus* (*Arch. de méd. expér.*, XI, 1899, p. 70).

Les tétrades, prises dans l'organisme et surtout observées dans les coupes de poumon ou de rein (fig. 222), paraissent entourées d'une enveloppe gélatineuse moins marquée que celle du Pneumocoque ; cette sorte de capsule manque aux coccus des cultures. Ces *Micrococcus* se colorent fortement par les couleurs d'aniline et *ne se décolorent pas* par la méthode de Gram ; la capsule ne se colore pas ou faiblement par les violets, mieux par l'éosine.

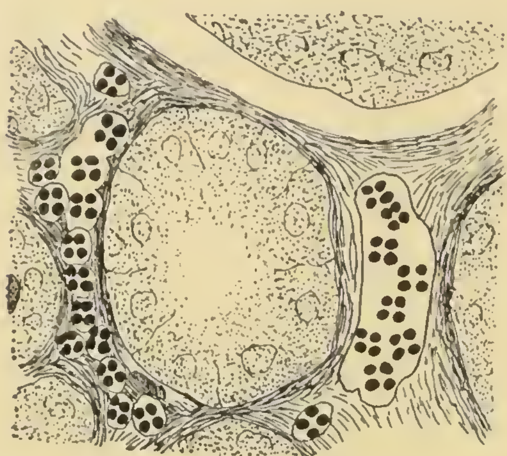


Fig. 222. — *Micrococcus tetragenus.* Rein de souris. 1200/1.

Cultures. — Le *Micrococcus tetragenus* se cultive bien sur tous les milieux. Il ne croît pas lentement. C'est une Bactérie aérobie, mais pouvant se contenter de très faibles quantités d'oxygène, et peut-être un anaérobie facultatif. La capsule manque toujours dans les cultures. L'optimum de température est vers 37°-39° ; à 20°, la végétation est très lente ; elle ne se fait plus au-dessous de 15°.

En culture sur *plaques de gélatine*, il donne, au bout de deux jours, de petits points blancs dans l'intérieur de la gelée ; à un faible grossissement, ces points ont une teinte gris jaunâtre, une surface granuleuse et des bords sinueux. Les colonies qui arrivent à la surface produisent de petites colonies bombées, d'un blanc brillant, d'aspect porcelané, atteignant 1 ou 2 millimètres de diamètre. *Il ne liquéfie jamais* la gélatine.

Sur *gélatine*, en piqûre, il forme, dans le canal de la piqûre, des colonies rondes isolées à la partie inférieure, confluentes à la partie supérieure ; à la surface, un bouton hémisphérique (fig. 223), blanc laiteux, un peu jaunâtre, ou un disque, déprimé au centre, de même nuance.

Sur *gélose*, on obtient, le long de la strie, des colonies rondes, blanches, un peu humides, qui confluent en un enduit blanchâtre, crémeux, très visqueux.

Dans le *bouillon*, il se développe bien ; il y forme un dépôt épais souvent de plusieurs millimètres, visqueux. Le bouillon devient très vite alcalin.

Le *lait* n'est pas coagulé par le *Tétragène* type, qui n'y végète que médiocrement. Chauffard et Ramond (1) ont rencontré un *Tétragène blanc* qui coagulait le lait, Achard et Gaillard (2) un *Tétragène doré* qui coagulait après ébullition.

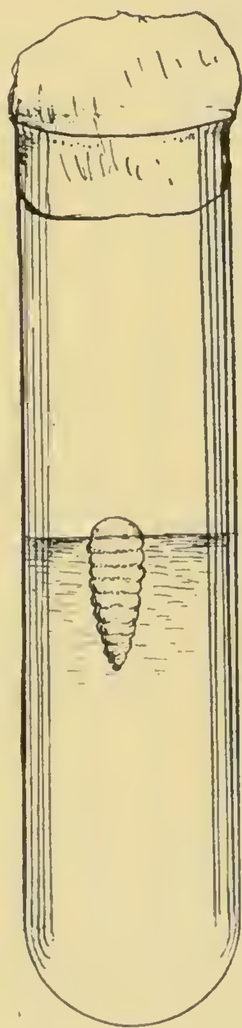


Fig. 223. — Culture de *Micrococcus tetragenus* sur gélatine.

(1) Chauffard et Ramond, Deux cas mortels de septicémie tétragénique (*Arch. de méd. expér.*, 1896, p. 304).

(2) Achard et Gaillard, Contribution à l'étude biochimique des genres Tétragène et Staphylocoque (*Arch. de méd. expér.*, XI, 1899, p. 96).

Sur *sérum coagulé*, le développement est rapide; il donne une culture épaisse, muqueuse.

Sur *pomme de terre*, il se forme de petites colonies blanches arrondies, qui confluent souvent en une bande blanche visqueuse.

PROPRIÉTÉS BIOLOGIQUES

C'est un microbe assez résistant, qui conserve facilement sa vitalité en cultures.

Sa virulence est très variable, tantôt nulle ou presque, le plus souvent bien marquée. Elle se renforce par passages dans les organismes réceptifs. Elle se conserve longtemps dans les cultures qui ne paraissent pas subir d'atténuation avec l'âge; les cultures de Biondi n'avaient encore rien perdu de leur virulence après vingt semaines; à l'Institut d'hygiène de Berlin, des cultures, fréquemment renouvelées, avaient encore, au bout de quatre ans, toute leur puissance d'infection.

Les bouillons de culture filtrés sont peu toxiques et pas pyogènes; il en est de même des produits stérilisés par la chaleur. Griffiths (1) a isolé des cultures une ptomaïne solide, blanche, cristallisable, en aiguilles prismatiques, soluble dans l'eau, tuant les animaux en trente-six heures.

INOCULATION EXPÉRIMENTALE

Les cultures sont virulentes pour les souris blanches et les cobayes; les souris de champs et de maison, les lapins, les chiens, les oiseaux paraissent peu sensibles ou réfractaires. Les souris blanches meurent souvent en vingt-quatre heures, après une inoculation sous la peau de très faibles quantités de culture, d'une véritable septicémie. Le sang renferme de nombreuses tétrades; on en trouve de gros amas dans le rein (fig. 222), le foie, la rate; les poumons sont hyperémiés, mais ne présentent pas d'hépatisation. Les cobayes meurent de trois à cinq jours, avec des symptômes moins marqués. Les animaux moins réceptifs, le lapin par exemple, ne présentent qu'une minime lésion locale; c'est, suivant la virulence, une simple escarre ou un abcès à évolution lente. L'inoculation par voie stomacale détermine, chez le cobaye, de la diarrhée, un amaigrissement rapide et la mort après quelques jours.

HABITAT ET RÔLE ÉTIOLOGIQUE

Miquel dit avoir isolé ce microbe de l'air.

Il est en tout cas commun chez l'homme et les animaux et son habitat de prédilection paraît être les voies digestives antérieures, surtout la bouche; de là, il peut facilement se répandre ailleurs. Koch le considérait comme un saprophyte, mais pensait cependant qu'il pouvait jouer un rôle actif dans le processus de destruction du tissu pulmonaire chez les phtisiques.

Il est fréquent dans les crachats des phtisiques, accompagnant souvent le *Bacille de la tuberculose* (fig. 220), ou dans le contenu purulent

(1) Griffiths, Ptomaïne du *Micrococcus tetragenus* (*C. R. de l'Acad. des sc.*, CXV, 1892, p. 418).

des cavernes. Biondi (1), sur cinquante personnes examinées à cet effet, l'a rencontré trois fois, sans qu'il y ait, chez les individus porteurs, d'indices d'affection pulmonaire. Il semblerait donc pouvoir se rencontrer, assez rarement toutefois, dans la salive à l'état normal. Il y a lieu toutefois de le distinguer de plusieurs espèces de *Sarcines* que l'on trouve dans ces mêmes conditions.

Il paraît pouvoir occasionner une véritable suppuration ; la statistique de Karlinski (2) montre qu'il est encore assez fréquent seul dans le pus d'abcès ou de furoncles. Chez l'homme, c'est le microbe que l'on rencontre le plus souvent dans le pus des abcès dentaires. Netter (3) l'a rencontré dans le pus d'empyème avec le Pneumocoque.

Faisans et Le Damany (4) le signalent dans un épanchement pleurétique, Bezançon et Lepage (5) dans le pus d'une méningite, Appert (6) dans des angines d'aspect assez spécial (angine sableuse de Dieulafoy) ; Lartigau (7) le dit assez commun dans les angines aiguës, où Carrière (8) l'a également rencontré. Il est amplement démontré que c'est un agent actif de suppuration chez l'homme : ce sont surtout, mais non exclusivement, les suppurations dentaires ou celles du voisinage de la cavité buccale qui sont sous sa dépendance. Des observations de Netter, de Chauffard et Ramond prouvent que ce microbe peut faire non seulement une lésion locale, mais une véritable infection généralisée, une *septicémie tétragénique* dont les lésions rappellent celles observées chez la souris à la suite d'inoculation virulente ; on le cite même comme agent de certaines infections puerpérales (9).

RECHERCHE ET DIAGNOSTIC

L'aspect si particulier, les cultures, l'inoculation à la souris, la coloration par la méthode de Gram, feront aisément reconnaître le *Micrococcus tetragenus*.

(1) Biondi, Die pathogenen Microorganismen der Speichels (*Zeitschr. für Hygiene*, II, 1887, p. 194).

(2) Karlinski, *Centralbl. für Bakt.*, VII, 1890, p. 113.

(3) Netter, Utilité des recherches bactériologiques pour le pronostic et le traitement des pleurésies purulentes (*Bull. de la Soc. méd. des hôp.*, 16 mai 1890, et *Sem. méd.*, 1890, n° 227).

(4) Faisans et Le Damany, Sur la présence du Tétragène dans les épanchements pleurétiques (*Soc. méd. des hôp.*, 2 juillet 1897).

(5) Bezançon et Lepage, Méningite suppurée localisée due au Microcoque tétragène (*Soc. méd. des hôp.*, 21 janvier 1888).

(6) Apert, Le Tétragène dans les angines (*Soc. de Biol.*, 29 janvier 1898).

(7) Lartigau, A contribution to the study of the Micrococcus tetragenus in acute angina (*The Philadelphia med. Journ.*, 22 avril 1899).

(8) Carrière, Angine à Tétragènes (*Revue de méd.*, 1902, n° 5, p. 552).

(9) Ooton et Oni, Infection puerpérale prolongée ; infection à Tétragènes (*Ann. de gynécol.*, mars 1909).

MICROCOCCUS INTRACELLULARIS MENINGITIDIS
Weichselbaum.

(*Diplococcus intracellularis meningitidis, Méningocoque, Diplocoque intracellulaire.*)

Atlas de microbiologie, pl. xx.

Weichselbaum (1) a décrit, en 1887, sous le nom de *Diplococcus intracellularis meningitidis* un microbe rencontré dans une série de cas de méningite cérébro-spinale épidémique, qu'il donne comme l'agent spécifique de cette affection. Marchiafava et Celli (2), en 1884, avaient déjà signalé à l'autopsie, dans deux cas de méningite cérébro-spinale, un diplocoque intracellulaire très semblable au *Gonocoque*.

Les recherches ultérieures, notamment beaucoup de travaux récents, ont confirmé en tous points les assertions de Weichselbaum et doivent faire reconnaître le Diplocoque de Weichselbaum comme le microbe spécifique de la méningite cérébro-spinale épidémique, le véritable *Méningocoque*.

D'autres espèces microbiennes, notamment le *Pneumocoque*, peuvent occasionner des processus similaires, comme on le verra plus loin à l'étude du *Rôle étiologique* ; la véritable spécificité est acquise au *Méningocoque*.

Malgré les rapports intimes que ce microbe peut présenter avec d'autres espèces, en particulier le *Gonocoque*, il semble bien démontré qu'il représente un type spécifique distinct. Ses caractères différentiels ont été bien fixés, après les recherches de Weichselbaum, par toute une série de bons travaux dont les plus importants sont ceux d'Albrecht et Ghon (3), de Bettencourt et França (4), de Lingelsheim (5), de Flexner (6), de Dopter et Koch (7).

MORPHOLOGIE

Caractères microscopiques. — Tel qu'on le rencontre dans le liquide céphalo-rachidien ou dans le pus de la surface des méninges, le *Méningocoque* se présente en diplocoques à éléments irréguliers, aplatis sur leur face de contact, rappelant l'aspect et les dimensions du *Gonocoque*,

(1) Weichselbaum, Ueber die Aetiologie der akuten Meningitis cerebrospinalis (*Fortschr. der med.*, 1887, nos 18, 19, p. 573, 620, 626).

(2) Marchiafava et Celli, Sur les Microbes de la méningite cérébro-spinale épidémique (*Gaz. degli Ospedali*, 27 janvier 1884).

(3) Albrecht et Ghon, Zur Frage der Morphologischen und biologischen Charakterisierung des Meningococcus intracellularis (*Centralbl. für Bakt.*, Originale, XXXIII, 1903, p. 496).

(4) Bettencourt et França, Ueber die Meningitis cerebrospinalis epidemica und ihren specifischen Erreger (*Zeitschr. für Hyg.*, XLVI, 1904, p. 463) ; et : Sur la méningite cérébro-spinale épidémique et son agent spécifique (*Arch. de l'Inst. royal de bactériologie Camara Pestana*, 1, 1906, p. 1).

(5) Lingelsheim, Meningokokken und verwandte Bakterien (*XIVe Intern. Kongress für Hygiene*. Berlin, 1907).

(6) Flexner, Contribution to the biology of Diplococcus intracellularis (*Journ. of exper. med.*, 1907).

(7) Dopter et Koch, Voy. surtout la thèse de Koch : Études bactériologiques sur le Méningocoque. Thèses de Paris, 1909.

en grains de café. Les diplocoques sont alors souvent inclus dans les leucocytes; toutefois on en rencontre de libres dans le liquide. Ils ne forment jamais de vraies chaînettes; seulement, parfois des diplocoques peuvent se trouver accidentellement rapprochés et sembler alors en courtes chaînes. Leur nombre est très variable; on peut rencontrer des leucocytes qui en renferment un grand nombre, en sont même littéralement bondés (fig. 224 et 225); il s'en trouve même parfois dans les noyaux. Ou bien on n'aperçoit que de rares éléments avec un ou deux diplocoques; la constatation du microbe peut être délicate au microscope, même dans des liquides purulents, en raison de sa rareté; il faut recourir à d'autres moyens, particulièrement aux cultures.

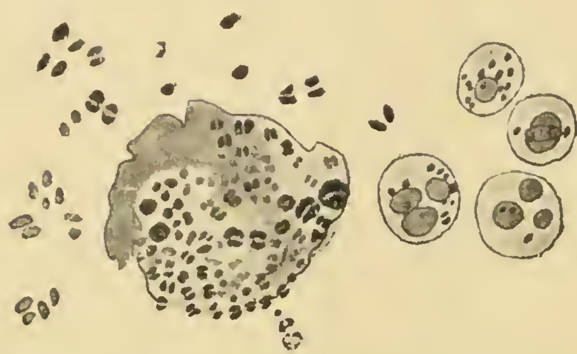


Fig. 224. — Pus de méningite cérébro-spinale (d'après Weichselbaum).



Fig. 225. — Liquide de ponction lombaire d'enfant atteint de méningite cérébro-spinale. 1200/1.

Dans les cultures, le microbe se présente en diplocoques très nets, asymétriques, en grains de café; on rencontre parfois quelques tétrades, ce qui n'arrive jamais pour le *Gonocoque*. Des formes plus grosses sont fréquentes, atteignant parfois quatre à cinq fois le diamètre des éléments ordinaires, véritables formes géantes; Flexner les considère comme des formes de dégénérescence; elles disparaissent vite des cultures.

Dans l'organisme ou dans les cultures, le microbe ne présente jamais de capsules, parfois cependant une mince auréole. Les éléments ne paraissent doués d'aucune motilité. On ne constate pas de formation de spores.

Coloration. — Le *Méningocoque* se colore bien par toutes les couleurs basiques d'aniline; très bien à la fuchsine phéniquée de Ziehl, au mieux à la thionine phéniquée. Certains éléments se colorent plus fortement que les autres ; on a voulu en faire des formes de résistance sans motifs suffisants. Dans les cultures, on trouve des éléments qui se colorent mal, à contours peu nets, semblant en dépérissement.

Il se *décolore toujours* par la méthode de Gram. Ce caractère, déjà mis en avant par Weichselbaum, paraît aujourd'hui strictement établi, et doit légitimement servir pour la différenciation.

Cultures. — C'est un aérobie strict. Il ne pousse pas à la température du laboratoire, commence à végéter faiblement à 25°, jamais au-dessous, et présente son optimum vers 37°. Il cultive encore à 42° (Albrecht et Ghon), même à 43° (von Ligelsheim).

Il végète au mieux dans les milieux à réaction neutre, mais peut aussi pousser sur les milieux légèrement alcalins.

Extrait directement de l'organisme, il ne cultive que très difficilement ou le plus souvent pas du tout sur les milieux artificiels ordinaires, mais pousse seulement sur des milieux spéciaux, et encore, au début, il n'y montre qu'une vitalité faible, exigeant des réensemencements tous les jours ou tous les deux jours. Après cinq ou six générations, il végète plus abondamment sur les milieux spéciaux et commence à se développer sur gélose ordinaire, lorsqu'on l'y ensemence largement ; puis il s'habitue à ce dernier milieu, s'y cultive bien et peut même y rester vivant pendant trois semaines.

Pour les premières cultures, il est nécessaire de se servir d'un milieu dont la composition se rapproche de celle de l'organisme, contenant de l'albumine animale, surtout humaine. Le microbe peut ensuite cultiver avec succès sur les milieux ordinaires des laboratoires.

Cultures en milieux solides. — Le milieu de choix est la *gélose-ascite*. On la prépare en incorporant, par une agitation douce, à de la gélose ordinaire à 2 p. 100, ou mieux à 3 p. 100, ce qui donne un milieu plus résistant pour la confection des plaques, maintenue fondue au-dessous de 60° pour éviter toute coagulation, un tiers ou un quart de liquide d'ascite stérile, soit recueilli aseptiquement (p. 238), soit stérilisé par chauffages répétés au-dessous de 70° (p. 258); le mélange doit être bien complet, fait en tubes, en ballons, ou versé en boîtes de Petri. On inocule en stries, après solidification du milieu.

Sur ce milieu, le *Méningocoque* forme en vingt-quatre heures, à 37°, de petites colonies arrondies, transparentes, un peu bleutées, ayant de 1 millimètre à 1 millimètre et demi de diamètre, parfois plus, à contours circulaires ou légèrement sinueux. La partie centrale est un peu plus épaisse et jaunâtre. Après deux ou trois jours, le diamètre atteint 3 ou 4 millimètres, la partie centrale s'épaissit un peu et fonce en couleur.

Au microscope, on distingue nettement une zone périphérique translucide, une zone opaque, granuleuse, jaunâtre, et souvent une sorte de noyau central foncé, noirâtre.

Après trois à quatre jours, on remarque, surtout dans la zone opaque, des taches foncées, irrégulières, de dimensions variables, qui seraient des dépôts cristallins (Bettencourt et França).

Les cultures en stries sont abondantes, luisantes, peu épaisses, d'un gris blanchâtre.

Ces cultures s'émulsionnent très facilement dans un liquide.

On peut remplacer le liquide d'ascite, qui toutefois paraît préférable, par des liquides de pleurésie, d'hydrocèle, par du sérum humain préalablement chauffé une demi-heure à 60° pour détruire son action bactéricide. On obtient également de bons résultats, quoique inférieurs, avec d'autres sérums, même avec du sérum antidiphtérique. On peut aussi employer le liquide céphalo-rachidien du malade lui-même, après la centrifugation ; il est nécessaire de le chauffer pendant une demi-heure à 60° pour faire disparaître son action méningolytique.

Le sérum peptonisé de Lœffler, usité pour la recherche du *Bacille diphtérique*, convient également ; les colonies qui s'y forment sont plus petites et plus difficiles à émulsionner que celles sur gélose-ascite.

La gélose au sang peut aussi servir, ainsi que les différents milieux spéciaux qui seront indiqués pour le *Gonocoque*. Sur la *gélose ordinaire*, où il pousse après entraînement, le microbe donne des colonies semblables à celles produites sur gélose-ascite.

Sur *pomme de terre*, le *Méningocoque* ne pousse pas ou donne quelquefois de toutes petites colonies punctiformes.

Cultures en milieux liquides. — Le milieu de choix est le *bouillon-ascite*, composé d'une partie de liquide d'ascite stérilisé pour trois de bouillon. Après plusieurs générations dans ce milieu, le *Méningocoque* pousse en bouillon ordinaire ; il y donne, comme en bouillon-ascite, un trouble homogène, avec un léger voile très fragile à la surface et un petit dépôt au fond.

Dans le *lait*, le développement se fait sans produire de coagulation.

L'addition de glycérine aux différents milieux ne produit aucun avantage ; le développement est plutôt même retardé.

PROPRIÉTÉS BIOLOGIQUES

La composition chimique du *Méningocoque*, dont il a été parlé page 51, n'indique rien de bien spécial, sinon une teneur élevée en composés organiques phosphorés.

Vitalité. — Elle paraît assez faible. Dans les produits pathologiques elle ne persiste pas très longtemps ; c'est certainement une cause d'insuccès fréquents dans les essais de cultures. Aussi doit-on toujours s'efforcer d'employer des produits fraîchement recueillis, au mieux au moment même de leur obtention hors de l'organisme. Il faut, en tout cas, lorsqu'on est obligé d'attendre, réduire le temps du transport à son minimum, éviter toutes les causes de destruction, particulièrement la dessiccation et la lumière, conserver le produit à une basse température. On a vu que l'accoutumance aux milieux de culture donnait au microbe une vitalité beaucoup plus grande.

Virulence. — La virulence est peu grande. L'inoculation sous-cutanée des cultures fraîches ne produit rien. L'inoculation intrapérito-

néale de doses assez fortes tue la souris et le cobaye. Les cultures perdent assez vite leur virulence.

Action des agents physiques. — La chaleur le tue facilement. D'après Bettencourt et França, dans des tubes capillaires chauffés à 50° le microbe est mort après cinq minutes ; à 60°, 70°, 80°, la mort est survenue après une minute. Il a résisté plus de deux heures à des froids de — 10° et — 20° ; d'après Flexner, une émulsion de cultures serait tuée après un séjour de cinq jours à 2°.

Il est très sensible à la dessiccation, qui le tue d'ordinaire en quelques heures ; il paraît résister plus quand il est protégé par un vernis albumineux, comme dans le pus ou le mucus nasal.

L'exposition aux rayons solaires le tue en deux à quatre heures. La lumière diffuse a une action moins énergique.

Action des agents chimiques. — Le *Méningocoque* est très sensible aux antiseptiques. D'après Bettencourt et França, le sublimé à 1 p. 1000 le tue immédiatement, l'acide phénique à 1 p. 100 en une minute, l'alcool à 70° en deux minutes, l'eau oxygénée à 1 p. 100 en dix minutes, la formaline à 1 p. 100 en dix minutes; d'après Dopter et Koch, l'essence d'eucalyptus, en vapeurs, le tue après une demi-heure à une heure.

Produits formés dans les cultures. — Les cultures ne donnent jamais la réaction de l'indol.

D'après les recherches de von Ligelsheim, de Dopter et Koch, le *Méningocoque* fait toujours fermenter le glucose et le maltose et n'a aucune action sur tous les autres sucres; c'est un caractère important pour sa différenciation. Wilson (1) et Symmers (2) ont constaté l'absence de toute fermentation avec le lévulose, le lactose, le saccharose, la dextrine, l'inuline, l'arabinose, le raffinose, la glycérine, l'érythrite, la mannite, la dulcite, la sorbite, le xylose, la salicine, l'amygdaline. Les produits formés aux dépens des sucres qui sont attaqués sont des acides organiques qui font virer au rouge la teinture de tournesol.

Toxines. — Les vieilles cultures en bouillon filtrées sur porcelaine sont toxiques pour la souris, même en inoculation sous-cutanée, comme l'ont montré von Ligelsheim et Leuchs (3). Mais le poison du *Méningocoque* paraît être une endotoxine très adhérente aux corps microbiens, qui n'est mise en liberté que par leur destruction.

D'après Flexner, le *Méningocoque* sécréterait des produits solubles qui lui sont nuisibles et arrivent à arrêter son développement dans les cultures ; il y aurait en particulier une substance diastasique exerçant une action dissolvante sur les éléments du microbe (autolyse), surtout morts, et sur de nombreuses autres espèces ; elle n'est détruite que par le chauffage à 70°.

INOCULATION EXPÉRIMENTALE

On a vu que la virulence était assez faible. Elle est, en plus, variable et très inconstante.

(1) Wilson, Observations of cases of streptococcal meningitis (*The Lancet*, 28 déc. 1907).
(2) Symmers, Discussion on cerebro-spinalis meningitis (*Brit. med. Journ.*, 31 octobre 1908, p. 1334).
(3) Von Ligelsheim et Leuchs, Tierversuche mit dem Diplococcus intracellularis *Klin. Jahrb.*, XV, 1906, p. 489).

L'inoculation sous-cutanée de liquide céphalo-rachidien ou de cultures jeunes, même à fortes doses, ne produit rien chez les animaux d'expérience.

Les inoculations dans la plèvre ou le péritoine sont fréquemment mortelles pour le cobaye ou la souris ; le lapin y résiste.

La souris est l'animal le plus sensible. A la suite de l'inoculation intrapéritonéale, la mort survient après seize à quarante-huit heures. On trouve dans le péritoine un exsudat assez abondant, renfermant de nombreux diplocoques. Généralement, le microbe reste localisé dans la séreuse ; on le trouve rarement dans le sang.

Chez le singe, l'inoculation intraspinale produit une maladie et des lésions semblables à ce qui se rencontre chez l'homme (1).

Dans l'inoculation expérimentale, la mort paraît plutôt due à l'action des produits toxiques mis en liberté par destruction des corps microbiens qu'à une infection véritable.

IMMUNITÉ ET SÉROTHÉRAPIE

On peut arriver à immuniser le lapin à l'aide d'inoculations sous-cutanées de cultures virulentes de Méningocoque. L'inoculation sous-cutanée ou l'injection intraveineuse de ces cultures, faites graduellement chez de grands animaux, la chèvre, le cheval, peu sensibles à l'action du microbe, les immunise cependant à l'égard de l'inoculation de très fortes doses de microbes amenés, par passages chez la souris ou le jeune cobaye, à un très haut degré de virulence.

Le sérum des animaux immunisés à l'aide de toxine méningococcique seule, de bouillons de culture filtrés sur porcelaine, est nettement antitoxique, neutralisant les effets des produits solubles du microbe ; il a seulement une action faible sur les microbes eux-mêmes, qu'il agglutine légèrement et irrégulièrement. L'inoculation des microbes vivants donne un sérum à la fois antitoxique et antimicrobien, qui renferme en notable proportion des agglutinines et des précipitines réellement spécifiques à côté de l'antitoxine spécifique.

De tels sérums ont un pouvoir immunisant certain, variable suivant leur mode de préparation et surtout l'importance des inoculations microbiennes qui ont été faites.

L'injection sous-cutanée d'une petite dose, un demi-centimètre cube, préserve la souris contre l'action d'une dose quatre à six fois plus forte de culture bien virulente en inoculation intrapéritonéale.

A la suite d'expériences heureuses faites sur le singe, Flexner (2) fut conduit en 1905 à expérimenter chez l'homme la sérothérapie antiméningococcique. Il obtint l'immunisation du cheval, en pratiquant d'abord des inoculations sous-cutanées de cultures tuées par la chaleur à 60°, à la dose d'un quart de culture au début jusqu'à quatre cultures.

(1) Flexner, Experimental cerebro-spinal meningitis in Monkeys (*Journ. of exper. Med.*, IX, 1907, n° 2, p. 142).

(2) Flexner, Experimental cerebro-spinal meningitis and its serum traitment (*Studies from the Rockefeller Institute for medical Research*. New-York, VI, 1907). — Concerning a serumtherapy for experimental infection with Diplococcus intracellularis (*Ibid.*, VII, 1907). — Flexner et Jobling, An analysis of 400 cases of epidemic meningitis treated with the antimeningitis serum (*Ibid.*, IX, 1909, et *Journ. of exper. Med.*, X, 1908, p. 141).

de semaine en semaine; puis des injections intraveineuses de cultures vivantes à doses croissantes de 1 öse, 3, 6 öses, un tube entier, puis de larges surfaces. Le traitement est complété par des injections sous-cutanées et intraveineuses d'un liquide d'autolyse du microbe, *autolysine*, obtenu en provoquant la destruction de microbes virulents dans la solution physiologique. En mélangeant diverses races virulentes de Méningocoque, il obtient ainsi un sérum polyvalent, à la fois antimicrobien et antitoxique.

Les inoculations sont généralement suivies, surtout celles de fortes doses, d'une réaction fébrile souvent intense et déterminent parfois la mort de l'animal.

Peu après Flexner, Kolle et Wassermann (1), en inoculant au cheval des cultures d'abord stérilisées par la chaleur, puis vivantes, obtinrent un sérum polyvalent par le mélange de trente races différentes de *Méningocoque*, un sérum monovalent très actif obtenu avec une race particulièrement virulente et un sérum antitoxique par l'injection intraveineuse de toxine. Leur sérum thérapeutique est le mélange, à parts égales, de ces trois sérums.

Dopter (2) prépare, à l'Institut Pasteur, un sérum antiméningococcique par l'inoculation sous-cutanée d'abord, puis intraveineuse de microbes vivants. Ce sérum est à la fois antimicrobien et antitoxique; dans les expériences sur les animaux, il se montre même plus antitoxique que le sérum préparé avec la toxine, ce qui ne doit pas surprendre, puisque la toxine du *Méningocoque*, véritable endotoxine, est très adhérente aux corps microbiens. Ce sérum est nettement agglutinant, souvent même à un taux élevé.

Kolle et Wassermann (3), se basant sur l'identité des antitoxines et des substances bactériolytiques, ce qui paraît encore douteux, estiment qu'il est possible d'évaluer la valeur d'un tel sérum à l'aide de la réaction de fixation du complément. Jobling (4) déclare cette méthode impraticable et donne comme bien préférable l'évaluation du pouvoir opsonisant.

D'après les remarques de Flexner et ses élèves, le sérum doit être injecté uniquement dans la cavité rachidienne; les injections sous-cutanées seraient pour ainsi dire inefficaces. On pratique la ponction lombaire comme il a été dit page 316, on évacue une quantité de liquide au moins équivalente à la quantité de sérum que l'on veut employer et on injecte ensuite le sérum tiédi vers 38°.

Les doses de sérum à injecter varient avec l'âge; on emploie d'ordinaire 10 centimètres cubes pour un enfant de moins d'un an, de 10 à 20 centimètres cubes pour les enfants plus âgés, de 20 à 40 centimètres cubes pour les adultes. Ces injections sont renouvelées par vingt-quatre heures aussi longtemps que les symptômes persistent et en raison de leur importance.

(1) Kolle et Wassermann, Versuche zur Gewinnung und Werthbestimmung eines Meningokokkenserum (*Deutsche med. Wochenschr.*, 1906, n° 16).

(2) Dopter, Les acquisitions récentes sur la méningite cérébro-spinale épidémique (*Congrès pour l'avancement des sciences*, 1909).

(3) Kolle et Wassermann, Versuche zur Gewinnung und Werthbestimmung eines Meningokokkenserum (*Deutsche med. Wochenschr.*, 1906, n° 16).

(4) Jobling, Standardisation of the antimeningitis serum (*Studies from the Rockefeller Institute for medical Research*, X, 1910).

Sous leur influence, les phénomènes pathologiques s'atténuent, puis disparaissent, tantôt rapidement, tantôt lentement et d'une façon irrégulière ; il est même des cas où l'action du sérum est minime ou nulle. Généralement, cependant, la durée de la maladie est beaucoup plus courte, la convalescence est plus rapide, les séquelles sont beaucoup moins fréquentes, même exceptionnelles.

La mortalité par méningite cérébro-spinale, avec l'emploi du sérum, subit une diminution très grande. Avant le sérum, la mortalité oscillait entre 65 et 80 p. 100. Elle est beaucoup moindre depuis. Dans la statistique de Flexner portant sur 442 cas, il a eu une mortalité globale de 33 p. 100, qui doit se réduire à 25,4 p. 100 en défalquant les cas où les injections ont été pratiquées dans des atteintes foudroyantes ou sur des moribonds. En Allemagne, avec le sérum de Kolle et Wassermann, 158 cas ont donné une mortalité de 18,35 p. 100. En France, 196 cas traités par le sérum de Dopter ont fourni 31 décès, soit une mortalité globale de 15,86 p. 100 ; on peut, de ces décès, en éliminer 12 portant sur des moribonds injectés *in extremis*, ce qui donne alors une mortalité de 10,32 p. 100. Netter, sur 133 cas observés, donne une mortalité de 10,9 p. 100. L'action bienfaisante du sérum apparaît partout évidente. Flexner et Netter font ressortir aussi, comme avantages très nets du traitement sérothérapique, la réduction de la durée moyenne de la maladie et la moindre fréquence des séquelles, portant le plus souvent sur le système nerveux ou les organes des sens, qui tombent à 8 p. 100 au lieu de 28 à 30 p. 100.

L'efficacité du traitement dépend dans une grande mesure de la date de l'intervention ; il importe de le commencer de bonne heure, sans même attendre le résultat de l'examen bactériologique, quitte à supprimer les injections si les indications sont contre la présence du *Méningocoque*. Si l'examen décelait d'autres microbes, *Pneumocoque* ou *Streptocoque*, les injections sont tout à fait inutiles, le sérum étant rigoureusement spécifique.

Le sérum agit comme antitoxique contre la toxine mise en liberté dans l'organisme, en entravant la pullulation du *Méningocoque* et en excitant la phagocytose par les opsonines qu'il contient. Les polynucléaires diminuent et font place aux mononucléaires plus actifs. Aussi, pour rechercher le microbe, doit-on faire le prélèvement de liquide *autant que possible* avant toute injection de sérum.

On remarque souvent une action manifeste et rapide sur le liquide céphalo-rachidien qui, s'il était trouble, s'éclaircit après chaque injection ; les *Méningocoques* y deviennent plus rares, prennent mal la coloration et peuvent ne plus pousser sur les cultures.

HABITAT ET ROLE ÉTIOLOGIQUE

Le *Méningocoque* se rencontre surtout chez l'homme atteint de méningite cérébro-spinale, où il montre une élection marquée pour la méninge cérébro-spinale. Dans le liquide céphalo-rachidien, dans le pus ou les flocons purulents, il est le plus souvent intracellulaire ; parfois, on le rencontre libre dans le liquide.

Il se trouve aussi dans la sécrétion rhino-pharyngée des malades, dans leur mucus nasal.

On l'a signalé dans le sang, dans de véritables cas de septicémie à Méningocoques pouvant précéder la méningite ou en être une conséquence, ou même évoluer sans accidents méningitiques (1). Weichselbaum et Ghon l'ont rencontré dans des végétations d'endocardite, Drigalsky dans des vésicules d'herpès. On a décrit des bronchopneumonies à Méningocoques. On l'a trouvé dans des exsudats de séreuses, péricarde, plèvre ; dans l'urine ; dans des suppurations oculaires.

Toutefois, il semble ne pas pouvoir rester longtemps dans le sang, mais avoir une tendance bien nette à se localiser sur les séreuses, et tout principalement sur les méninges cérébro-spinales.

La muqueuse du rhino-pharynx paraît être sa porte d'entrée ; de là, il peut atteindre l'encéphale, peut-être par la lame criblée de l'ethmoïde et les sinus. Profitant d'un traumatisme de la muqueuse, il serait transporté par la voie lymphatique. On a aussi mis en avant une infection intestinale à la suite de déglutition du mucus rhino-pharyngé.

On ne sait que bien peu de choses relativement à sa présence hors du malade, dans le milieu extérieur.

A cause de sa grande fragilité, de son peu de résistance à la dessiccation surtout, il ne peut guère se conserver dans le milieu extérieur proprement dit, mais seulement chez l'homme, à la surface de la muqueuse. On est en droit de penser que c'est l'homme seul qui le transmet à l'homme. C'est surtout l'homme atteint de rhino-pharyngite, d'angine qui peut être très légère quand il reste à la surface de la muqueuse, de méningite quand il pénètre plus loin. C'est aussi l'homme sain, en apparence du moins. De très nombreux examens dénotent l'influence de *porteurs de germes*, qui l'ont pris au contact de malades et le véhiculent, souvent sans en souffrir eux-mêmes, mais constituant un redoutable danger de propagation. De nombreuses observations épidémiologiques, basées sur des constatations bactériologiques bien établies, prouvent la réalité et la très grande importance de ce mode de transmission. Ces porteurs de germes ont le rôle primordial dans la création de foyers épidémiques. Il devient dès lors d'un haut intérêt de les reconnaître, car il faut combattre les dangers de contagion aussi bien chez eux que chez les malades ; ils sont aussi dangereux que ces derniers pour la transmission du contage.

Le *Méningocoque* ne paraît pas être un commensal habituel de la muqueuse, chez l'homme, comme l'est le *Pneumocoque*. Gaffky l'a recherché sans le rencontrer chez de nombreuses personnes de régions où ne sévissait pas la maladie, n'ayant jamais eu le moindre contact avec des malades. Au contraire, d'après von Ligelsheim et d'autres, dans les régions où existe la méningite cérébro-spinale, on rencontre d'ordinaire de nombreux *porteurs de germes* sains autour des malades. Ces porteurs créent alors ou des foyers épidémiques ou des cas sporadiques.

Ce qui contribue à rendre les malades ou les porteurs de germes sains plus dangereux, c'est la persistance parfois très grande du *Méningocoque* dans leur rhino-pharynx.

(1) Netter et Debré, Méningococcémie sans méningite (*Acad. de méd.*, 27 juillet 1909).

Les statistiques suivantes sont intéressantes à ce point de vue.

Bruns et Hohn donnent ces chiffres portant sur 80 porteurs de germes :

Chez 28	le Méningocoque a disparu au bout de	....	8	jours.
18	— —	....	2	semaines.
13	— —	....	3	—
10	— —	....	4	—
4	— —	....	5	—
3	— —	....	6	—
2	— —	....	7	—
1	— —	....	8	—
1	— —	....	11	—

D'après Bochalli sur 29 porteurs :

Chez 9	le Méningocoque a disparu au bout de	....	7	jours.
12	— —	....	14	—
6	— —	....	3	semaines.
2	— —	....	4	—

Chez ses malades, von Ligelsheim a observé la disparition du *Méningocoque* dans les durée et proportion suivantes :

Dans les 5 premiers jours	66,6 p. 100	des cas.
De 6 à 10 jours	24,56	—
Plus de 10 jours	11,29	—
Plus de 3 semaines	4,39	—

On peut penser avec von Ligelshem qu'en moyenne la persistance ne dépasse guère quinze jours. Setter l'aurait vu durer quatre et sept mois.

Il est des milieux qui semblent atteints de préférence ; ce sont ceux où existent la malpropreté, la misère, où les habitations sont des plus insalubres, sales et encombrées. Avant tout doit-on placer la promiscuité ; c'est pourquoi la maladie est si fréquente dans les casernes, dans les établissements où se pratique la vie en commun. Peut-être doit-on faire intervenir comme conditions prédisposantes des lésions chroniques de la muqueuse, l'état adénoïdien. Mais tout semble bien dépendre des facilités de la transmission.

Il en résulte, pour les malades, l'importance de l'isolement et de la désinfection de la muqueuse du rhino-pharynx. Puis parallèlement, pour les personnes qui les ont approchés, la recherche du *Méningocoque* à la surface de leur muqueuse, la reconnaissance des porteurs de germes, auxquels on doit appliquer les mêmes mesures qu'aux malades jusqu'à la disparition complète du microbe, disparition qui paraît se faire d'ordinaire après trois semaines ou un mois.

Le *Méningocoque* peut se trouver en association avec d'autres espèces intervenant aussi dans le processus méningitique ; on a signalé des méningites mixtes, tuberculeuses et méningococciques à la fois (1).

(1) Combe, Sur un cas de méningite mixte tuberculeuse et méningococcique (*Soc. méd. des hôp.*, 22 avril 1910).

RECHERCHE ET DIAGNOSTIC

C'est l'examen bactériologique seul qui peut permettre de poser un diagnostic exact de la méningite cérébro-spinale. C'est aussi l'examen bactériologique seul qui peut faire reconnaître l'existence du *Méningocoque* sur la muqueuse du rhino-pharynx, déceler les porteurs de germes.

La recherche du *Méningocoque* comporte deux temps, deux séries d'opérations bien différentes, qui peuvent se passer sur le même individu ou être exécutées séparément :

1° La recherche dans le liquide céphalo-rachidien ;

2° La recherche dans le mucus rhino-pharyngien.

Dans le premier cas, l'examen doit porter sur le liquide céphalo-rachidien ; dans le second, sur le mucus du nez, de la gorge ou de l'arrière-gorge.

Liquide céphalo rachidien. — Le liquide céphalo-rachidien doit être recueilli au moyen de la ponction lombaire, exécutée comme il a été dit page 315.

Il y a d'autant moins à hésiter à pratiquer la ponction et à la renouveler autant qu'il peut être nécessaire, que la soustraction de liquide céphalo-rachidien dans le cas de méningite diminue la pression dans la cavité méningée et a des effets thérapeutiques plutôt favorables ; de plus, elle permet l'introduction de sérum antiméningococcique dans cette cavité sans la dilater encore plus, ce qui pourrait entraîner certains inconvénients.

L'opération est généralement facile et inoffensive. Il est cependant bon d'être prévenu qu'il peut, dans certains cas, se produire des accidents le plus souvent légers, quelquefois graves, même mortels (p. 317).

Le liquide obtenu par ponction lombaire peut être limpide, louche ou franchement purulent avec flocons ou filaments, incolore, parfois jaunâtre ou teint en rose ou rouge par du sang.

A cause de la faible vitalité du microbe, de sa destruction possible et assez rapide par autolyse, il est à recommander d'en user aussitôt que possible après son obtention. S'il doit être transporté, ce doit être avec précautions et aussi rapidement qu'on le peut, en évitant les chocs, les écarts de température.

Ce liquide est soumis à la centrifugation, pendant un temps variable suivant sa teneur en éléments figurés. Les liquides limpides doivent souvent être centrifugés pendant longtemps pour pouvoir fournir un culot quelque peu appréciable.

Une partie du culot sert à faire des préparations microscopiques ; le reste est réservé pour faire des ensemencements sur les milieux de culture propices.

Le liquide sera conservé pour servir à d'autres réactions, s'il était nécessaire, notamment à la réaction de précipitation.

Mucus nasal. — Le mucus à examiner doit être recueilli autant que possible dans les fosses nasales postérieures, le mucus nasal proprement dit donnant souvent des résultats négatifs lorsque du *Méningocoque* se trouve cependant sur la muqueuse du rhino-pharynx. Pour le prélever, il faut abaisser la langue et, à l'aide d'un tampon d'ouate analogue à celui décrit page 315, dont on a coudé l'extrémité à angle assez obtus, on

frotte la partie située au-dessus du voile du palais; il ramène un mucus clair ou purulent, à l'aide duquel on fait des préparations microscopiques et des ensemencements.

Préparations microscopiques. — On fait une série de préparations en étendant sur des lames une petite quantité du culot de centrifugation ou des flocons purulents du liquide, ou en faisant, après flambage des lamelles pour stérilisation, des frottis avec le tampon d'ouate obtenu comme il vient d'être dit. Après séchage et fixage, on colore à la fuchsine phéniquée ou, mieux, à la thionine phéniquée. On examine au microscope.

La recherche du microbe sur les préparations colorées est tantôt facile lorsque les éléments sont nombreux, tantôt longue et difficile lorsqu'ils sont rares. On peut en trouver dans tous ou presque tous les globules de pus que l'on rencontre; certains peuvent même en contenir un très grand nombre (fig. 224 et 225, p. 496). Ou bien, au contraire, les diplocoques sont très rares, en très petit nombre, si bien qu'il faut une minutieuse recherche pour en découvrir. Lorsque l'on constate la présence de diplocoques intracellulaires, ou même de diplocoques libres dans le liquide, il faut, pour s'assurer que ce sont des *Méningocoques*, faire intervenir les éléments de différenciation.

Les préparations colorées seront traitées par la méthode de Gram. Le *Méningocoque* se décolore régulièrement par cette méthode. Les microbes restant colorés n'appartiendront pas à cette espèce. (Il sera bon de faire une coloration de fond, par exemple avec de la fuchsine très diluée.) La différenciation d'autres espèces, qui, comme lui, se décolorent par la méthode de Gram, devra être faite par d'autres moyens, cultures en milieux divers, réactions humorales diverses.

Pour le mucus rhino-pharyngien, le simple examen microscopique ne peut guère donner de résultats utiles, à cause de la fréquence des Pseudo-méningocoques.

Cultures. — On ensemencera sur gélose-ascite, coulée en boîtes de Petri. Une parcelle de produit sera déposée à la surface de la gelée, puis largement étalée sur toute la surface avec une öse de platine; l'öse servira ensuite pour frotter de même une ou deux autres boîtes, sans être rechargée.

Pour le mucus des porteurs sains, où le Méningocoque peut être très rare, on dépose du mucus sur un coin de la plaque et on l'étale très largement sur toute la plaque, en frottant à plusieurs reprises, au mieux avec un fil de platine terminé en triangle assez large, formant étaleur.

Les boîtes seront mises à l'étuve à 37°, pendant vingt-quatre heures. Après ce laps de temps, on peut trouver des colonies plus ou moins nombreuses. Les colonies bien isolées seront examinées à un faible grossissement. Celles qui présentent les caractères décrits plus haut (p. 497), qui, il faut le dire, ne renseignent que bien peu pour une diagnose certaine, serviront à faire des préparations colorées qui permettront d'éliminer tout ce qui n'est pas en diplocoques et qui reste coloré par la méthode de Gram. Les colonies montrant des diplocoques se décolorant par la méthode de Gram seront réservées pour un examen ultérieur, cultures en milieux sucrés, agglutination, précipito-réaction, etc., où le *Méningocoque* se comporte d'une façon spéciale.

Fermentation des sucres. — Le *Méningocoque* fait fermenter le glu-

cose et le maltose en donnant un acide organique, qui peut alors faire virer de la teinture de tournesol ou modifier d'autres matières colorantes. Von Ligelsheim se sert d'une solution de 10 p. 100 de glucose dans de l'eau légèrement tournesolée avec de la teinture bien neutre, qu'il stérilise par plusieurs chauffages à 100° pour éviter toute caramélisation. A 13cc,5 de gélose-ascite liquide il ajoute 1cc,5 de solution sucrée tournesolée. Le mélange bien effectué est coulé en boîte de Petri. Après solidification, on ensemence en stries le produit de culture et on met à l'étuve à 37°. Après vingt-quatre heures, on distingue les stries ou les colonies qui ont rougi le milieu.

Dopter et Koch (1) recommandent la gélose-ascite additionnée de rouge neutre, employée de la façon suivante : on prend 75 centimètres cubes de gélose ordinaire à laquelle on ajoute 1 gramme de glucose. On stérilise, on refroidit au-dessous de 60°, puis on ajoute 25 centimètres cubes de liquide d'ascite et 1 centimètre cube d'une solution stérilisée de rouge neutre à 1 p. 100. Le milieu prend une teinte orangée. On maintient le mélange au bain-marie à 60° pendant une heure environ, jusqu'à ce qu'il se forme un fin précipité grâce auquel la réaction colorante sera beaucoup plus nette (on peut cependant négliger cette recommandation). On agite et répartit en trois ou quatre boîtes de Petri. Après prise du milieu, on ensemence par stries, comme il a été dit plus haut, et on met à l'étuve, à 37°, en ayant soin de retourner les boîtes. Avec le *Méningocoque*, les stries ou les colonies ont une teinte rouge carminé caractéristique qui contraste nettement avec la teinte jaunâtre du milieu.

Si l'on a beaucoup de colonies à vérifier, pour éviter la confection d'un grand nombre de plaques on peut recourir à l'artifice suivant. A l'aide de traits à l'encre faits sur l'extérieur du fond du cristallisoir qui contient la gelée, on divise la surface en un certain nombre de secteurs, huit, dix, jusqu'à une vingtaine, et au milieu ou vers la partie extérieure, mais jamais tout près du bord à cause des contaminations plus faciles, de chacun de ces secteurs, on ensemence par un gros point les colonies à examiner. Un numéro placé à l'angle des secteurs permet facilement les distinctions.

On peut aussi se servir de bouillon glucosé à 1 p. 100, additionné d'un tiers de liquide d'ascite ou de sérum, puis de solution stérilisée de rouge neutre. Avec le *Méningocoque*, le lendemain la coloration a passé au jaune-canari avec fluorescence verte.

Agglutination. — Le sérum antiméningococcique agglutine le *Méningocoque* à un taux assez élevé, généralement à 1 p. 500 ou 1 p. 1000. On peut faire l'agglutination microscopique : il est plus simple de pratiquer l'agglutination macroscopique. On prépare une série de dilutions de sérum, prenons celui de Dopter, dans l'eau physiologique à des taux variés, 1/10, 1/50, 1/100, 1/200, 1/500 par exemple. On met, dans de petits tubes à agglutination, 1 centimètre cube environ de chaque dilution et on y émulsionne parfaitement, sans grumeaux, une öse de la culture sur gélose-ascite âgée d'une vingtaine d'heures. Les tubes sont placés vingt-quatre heures dans l'étuve à 37°. En examinant les tubes

(1) Dopter et Koch, Action du Méningocoque et des Bactéries similaires sur les milieux sucrés au neutralroth (*Soc. de Biol.*, 24 octobre 1908).

par transparence, en les tenant presque horizontalement, un peu au-dessus de la tête, dans la direction d'une fenêtre ou d'une source de lumière (Koch), on distingue facilement si l'agglutination est positive, à la formation de petits amas blanchâtres qui se sont formés dans le liquide éclairci. La comparaison avec des tubes témoins, préparés en émulsionnant la culture dans la solution physiologique seule, permet de constater nettement la différence. Lorsque l'agglutination se fait mal, Kutscher recommande d'opérer en maintenant les tubes à 55°.

Le sérum antiméningococcique reste sans effet agglutinant sur beaucoup d'espèces voisines. Il agglutine le *Gonocoque* à un taux élevé, parfois autant que le *Méningocoque*, on a même vu plus. Nous verrons plus loin les caractères qui permettent de différencier les deux types. On n'a pas à en faire la différenciation à ce point de vue dans le liquide céphalo-rachidien ou le mucus rhino-pharyngien ; mais le fait peut se présenter avec le sang.

Parmi d'autres espèces similaires, qui seront étudiées plus loin sous la dénomination de *Pseudo-méningocoques*, l'agglutination se produit pour le *Diplococcus crassus*, le *Méningocoque de Jaeger*, à un taux assez élevé, à 1 p. 100, même 1 p. 200. Ce dernier microbe pourrait alors être confondu avec certains *Méningocoques* qui sont plus faiblement agglutinés. Dans ce cas, pour la différenciation, il faut recourir à d'autres caractères : le *Diplococcus crassus* reste coloré par la méthode de Gram et ne fait pas fermenter le glucose ; de plus, le sérum anticrassus n'agglutine pas le *Méningocoque* et est fortement agglutinant pour le *Diplococcus crassus*. D'après Dopter, cette agglutination d'autres espèces serait due à la présence dans le sérum, à côté de l'agglutinine réellement spécifique, d'hétéro-agglutinines ou agglutinines de groupe, douées d'une spécificité beaucoup moins précise, pouvant agir sur plusieurs espèces d'un même groupe.

Les sérums antiméningococciques, seulement antitoxiques et pas antimicrobiens, n'agglutinent le *Méningocoque* qu'à un taux peu élevé, 1 p. 50 ou 80, parfois même sont sans action.

Précipito-réaction (1). — Même en dehors de la constatation directe du *Méningocoque* dans le liquide céphalo-rachidien, il est possible d'en reconnaître la présence à l'aide de la réaction de précipitation. Ce liquide renferme très tôt, peu après le début des symptômes, des produits solubles ou des produits d'autolyse du microbe ; éclairci par la centrifugation, il se trouble lorsqu'il est mis en présence d'un sérum antiméningococcique contenant des précipitines.

C'est le cas pour les sérums polyvalents, particulièrement le sérum de Flexner. Le sérum doit être aussi récent que possible et au mieux non additionné d'acide phénique ; l'âge, l'acide, l'exposition à l'air diminuent assez vite le pouvoir précipitant.

On se sert de tubes à essai très propres, stérilisés, d'un diamètre de 16 millimètres environ, les tubes étroits rendant plus difficiles la constatation de l'opalescence. On mélange dans un tube 100 gouttes de liquide céphalo-rachidien complètement éclairci par centrifugation et 6 gouttes du sérum ; on prépare un tube témoin avec du liquide céphalo-

(1) Vincent, Le diagnostic de la méningite cérébro-spinale par la méthode de la précipito-réaction (*XVIe Congr. intern. de méd.*, Budapest, 1909). — Vincent et Bellot, *Acad. de méd.*, 16 mars 1909.

rachidien seul. On met à l'étuve à 37°, ou mieux à 55°. Les tubes sont examinés après un séjour de dix à seize heures à l'étuve. S'il y a présence du *Méningocoque*, le premier tube montre une opalescence plus ou moins marquée, qui peut se constater au mieux sur fond noir, alors que le tube témoin reste entièrement clair.

Le liquide céphalo-rachidien doit être très récent. Lorsqu'il doit attendre, il faut le conserver au froid et surtout à l'obscurité.

Il faut savoir que parfois ce liquide, surtout lorsqu'il est un peu ancien, peut se troubler spontanément à l'étuve, le tube témoin peut être opalescent. Dans ce cas, l'épreuve doit être considérée comme nulle. Lorsque le tube témoin reste très clair, la réaction peut être considérée comme positive, même avec une faible opalescence dans le tube du mélange.

D'après Vincent, cette précipito-réaction se montre positive uniquement dans les cas de méningite à *Méningocoque* ; avec les liquides céphalo-rachidiens non méningococciques (méningites dues à tous autres microbes), elle est constamment négative. Il reste cependant à savoir si des espèces très voisines, comme le *Gonocoque* et le *Diplococcus crassus*, n'ont, elles, aucune action précipitante sur le sérum antiméningococcique.

Réaction de fixation du complément. — D'après les recherches de Kolle et Wassermann (1) et de Krumbein et Schatiloff (2), cette réaction donnerait des indications très sûres. Elle peut être employée soit pour la détermination d'un microbe que l'on pense être le *Méningocoque*, soit pour démontrer la présence, dans un liquide céphalo-rachidien, dans un sérum sanguin de malade, de produits de sécrétion, de désagrégation, d'autolyse, du *Méningocoque*. La réaction paraissant bien rigoureusement spécifique, les conclusions obtenues peuvent dès lors être regardées comme certaines.

Pour la détermination d'un microbe que l'on a en cultures, on se sert, comme antigène, d'une émulsion microbienne dans la solution physiologique. Pour la constatation de la présence de produits d'origine méningococcique, on prend, comme antigène, un liquide pouvant contenir des toxines ou des produits d'autolyse du *Méningocoque*. A cet antigène, on ajoute du sérum antiméningococcique, préalablement chauffé à 56° pendant une demi-heure, pour détruire son complément en ne conservant que la sensibilisatrice; puis du sérum de cobaye normal, riche en complément. Si la sensibilisatrice est spécifique, c'est-à-dire si l'émulsion microbienne contient bien du *Méningocoque*, si le liquide renferme bien de la toxine méningococcique ou des produits d'autolyse du *Méningocoque*, elle fixera le complément du sérum neuf de cobaye, il n'y aura plus de complément libre dans le mélange. En ajoutant alors un système hémolytique inactivé (p. 416), un sérum hémolytique chauffé additionné d'hématies, il ne se produira pas d'hémolyse, le liquide restera incolore. Dans le cas contraire, si le microbe de l'émulsion n'est pas du *Méningocoque* ou s'il ne se trouve pas de produits d'origine méningococcique dans le liquide, le complément du sérum de cobaye

(1) Kolle et Wassermann, Versuche zur Gewinnung und Werthbestimmung eines Meningokokkenserum (*Deutsche med. Wochenschr.*, 1906, n° 16).

(2) Krumbein et Schatiloff, Untersuchungen über antimeningokokken Serum (*Deutsche med. Wochenschr.*, 1908, n° 23).

sera libre dans le liquide et agira alors sur le système hémolytique ; l'hémolyse se produira, colorant le liquide en rouge.

Si l'on veut éprouver le sérum d'un malade, on le substituera dans l'opération précédente au sérum antiméningococcique, après l'avoir chauffé à 56° pendant une demi-heure, en prenant comme antigène une émulsion de culture d'un *Méningocoque* éprouvé. Il en sera de même si l'on veut partir d'un liquide céphalo-rachidien. Les résultats seront à interpréter comme ci-dessus.

Tous ces caractères, lorsqu'on peut les constater, permettent d'identifier le *Méningocoque* et de le distinguer d'autres microbes présentant avec lui des ressemblances plus ou moins grandes ou pouvant se rencontrer aussi dans des processus méningitiques rappelant parfois beaucoup la méningite cérébro-spinale à *Méningocoque*. Parmi ces espèces se trouvent surtout le *Gonocoque* et les *Pseudo-méningocoques*.

Dopter a signalé, dans le rhino-pharynx, la présence de *Paraméningocoques*, n'agglutinant pas le sérum, mais donnant des résultats positifs à la réaction de fixation du complément ; pour cette dernière raison, il croit devoir les reconnaître pour des *Méningocoques* vrais.

DIFFÉRENCIATION DU GONOCOQUE

Le *Méningocoque* et le *Gonocoque* présentent entre eux de très grandes ressemblances, qui avaient déjà été signalées par les premiers observateurs. Des deux côtés, même aspect et même forme des éléments, en diplocoques asymétriques, mêmes dimensions, même situation intracellulaire dans les globules de pus, à tel point qu'à l'examen de préparations de pus blennorragique ou de pus de méningite cérébro-spinale, en ne tenant pas compte de la présence d'autres éléments, cellules épithéliales de l'urètre, etc., il serait impossible de faire la distinction. Egalement, mêmes caractères de coloration, et surtout, dans les deux cas, nette décoloration à la méthode de Gram.

En outre, tous deux présentent une faible vitalité, périssent facilement à la température ordinaire. Ils cultivent mal ou pas du tout sur les milieux ordinaires, bien au contraire sur les milieux additionnés de sang ou de sérosités, surtout de provenance humaine. Chez l'homme, ils déterminent des processus pathologiques similaires, des suppurations tout à fait localisées en des points déterminés, ou des accidents de septicémie.

Les caractères des cultures présentent de légères différences ; mais ce sont des distinctions bien secondaires. Il est nécessaire de pousser beaucoup plus loin pour arriver à établir leur différenciation.

Certains observateurs, ayant étudié surtout le *Gonocoque*, ont conclu à l'identité spécifique des deux microbes. L'application très précise des méthodes nouvelles, faite en particulier par Vannod (1), Bruckner et Christeanu (2), Dopter et Koch (3), les ont conduits à conclure en faveur d'une distinction complète.

(1) Vannod, Contribution à l'étude du Gonocoque (*Centralbl. für Bakt.*, 1 Abth., Orig., XLIV, 1907, p. 10 et 110).

(2) Bruckner et Christeanu, Sur l'agglutination du Méningocoque par un sérum gonococcique (*C. R. de la Soc. de Biol.*, 1906, n° 19).

(3) Dopter et Koch, *loc. cit.*, p. 507.

L'étude de la *fermentation des sucres* montre déjà une différence bien établie : le *Méningocoque* fait toujours fermenter le glucose et le maltose ; le *Gonocoque*, le glucose, mais pas le maltose.

L'étude de l'*agglutination* dénote une certaine différence, bien que, de ce côté, les rapports entre les deux types apparaissent d'une façon évidente. Le sérum antiméningococcique agglutine le *Méningocoque* et le *Gonocoque* ; de même, le sérum antigonococcique agglutine aussi les deux microbes. On trouve cependant des différences importantes, lorsqu'on étudie de plus près les conditions de l'agglutination. Le sérum antiméningococcique agglutine le *Méningocoque* à 1 p. 400 ou 500 au moins, et le *Gonocoque* à 1 p. 200 ou 250 : il y a une différence notable dans le taux de l'agglutination. De plus, Dopter et Koch ont montré que cette agglutination du *Gonocoque* par le sérum antiméningococcique n'était pas due à l'agglutinine spécifique, mais à des agglutinines secondaires, agglutinines de groupe, coagglutinines, de spécificité toute relative, que renferme ce sérum. En faisant disparaître ces dernières par une technique appropriée qui respecte l'agglutinine spécifique (Voy. Thèse de Koch, p. 82), ce sérum devient alors tout à fait inactif pour le *Gonocoque*, et conserve tout son pouvoir agglutinant pour le *Méningocoque* ; son action réellement spécifique est uniquement pour le Méningocoque.

La *réaction de fixation du complément*, qui, elle, apparaît comme rigoureusement spécifique et n'aurait rien de relatif comme l'agglutination et la précipitation, établit nettement la distinction. La sensibilisatrice qui est contenue dans le sérum antiméningococcique ne fixe pas le complément sur un antigène gonococcique ; l'hémolyse se produit avec un système hémolytique voulu. Inversement, la sensibilisatrice du sérum antigonococcique ne fixe pas le complément sur un antigène méningococcique ; l'hémolyse a lieu également dans ces conditions. Il n'y a donc pas ici la spécificité qui devrait exister si l'on était en présence d'une seule et même espèce.

Il y a bien lieu de regarder actuellement le *Méningocoque* et le *Gonocoque* comme deux espèces distinctes.

LES PSEUDO-MÉNINGOCOQUES

On a rapproché du *Méningocoque* d'autres microbes rencontrés dans les mêmes conditions, soit dans le mucus du rhino-pharynx, soit dans le liquide céphalo-rachidien ou les exsudats méningés, seuls ou associés au *Méningocoque* fréquemment dans des processus méningitiques, d'autres fois dans d'autres manifestations morbides ou même à l'état normal.

Le *Méningocoque* n'est pas le seul microbe qui puisse déterminer de la méningite ; beaucoup d'autres peuvent agir de même et être les agents de manifestations cliniquement diagnostiquées méningite cérébro-spinale, même parfois à tendance nettement épidémique. Il en est ainsi surtout pour le *Pneumocoque*, le *Streptocoque*, le *Staphylocoque doré*, le *Streptocoque de Bonome* qui paraît du *Pneumocoque* ou de l'*Entérocoque* plutôt qu'une espèce distincte (p. 490), et aussi, mais tout à fait en seconde ligne, le *Bacille de la tuberculose*, le *Bacille typhique*, même le *Gonocoque*. Ces microbes se distinguent facilement du *Méningocoque* par leurs caractères bien connus et nettement différentiels.

Le tableau suivant, dressé par Wolf (1), portant sur 174 cas de méningite cérébro-spinale, donne des indications importantes sur la présence de diverses espèces microbiennes :

Pneumocoque	44,25 p. 100.
Méningocoque	34,48 —
Staphylocoque doré	3,45 —
Streptocoque	8,05 —
Bacille de Friedlaender	1,15 —
— typhique	2,87 —
— de Neumann-Schäffer	1,72 —
Autres Bacilles (*Bacillus coli, B. aerogenes meningitidis, B. mallei*)	2,87 —
Pas de microbes	1,15 —

Deux statistiques de Netter, portant sur des épidémies parisiennes et comprenant 67 cas, donnent les proportions suivantes :

	1re.	2e.	Total.
Pneumocoque	11	7	18
Méningocoque	12	6	18
Streptocoque de Bonome	13	4	17
Streptocoque pyogène	7	3	10
Staphylocoque doré	3	1	4
	46	21	67

Les données d'autres observateurs se rapprochent de ces dernières et montrent le rôle très important du *Pneumocoque* dans ce processus.

Le *Streptocoque de Bonome* (2), isolé en 1889 de pus de méningite cérébro-spinale, est à rapprocher de l'*Entérocoque*, dont il possède la plupart des caractères, ou du *Pneumocoque*, dont il se sépare cependant par le fait qu'il pousse sur gélatine à la température ordinaire.

Il n'en est plus de même d'autres microbes qui se rencontrent dans les conditions où l'on trouve le *Méningocoque*, dans le liquide céphalo-rachidien ou le mucus rhino-pharyngien, rappelant beaucoup le *Méningocoque* par leur aspect et divers caractères. C'est à ceux-là qu'il faut réserver le nom de *Pseudo-méningocoques*. Parmi eux, il en est qui peuvent être dangereux pour l'homme, déterminer des processus méningitiques, même de vrais symptômes de méningite cérébro-spinale avec épidémicité; d'autres se trouvent dans le mucus rhino-pharyngien, sans action connue sur l'organisme. C'est le cas des espèces désignées sous les noms de *Diplococcus crassus* de Jaeger (3), *Micrococcus catarrhalis* de Pfeiffer (4), *Streptococcus mucosus*, *Diplococcus mucosus*, *Micrococcus cinereus*, *Diplococcus pharyngis flavus*, *Diplococcus pharyngis siccus* de Ligelsheim (5).

(1) Wolf, Ein Beitrag zur Aetiologie der circumskripten Meningitis (*Berl. klin. Wochenschr.*, 1897, n° 10).

(2) Bonome, Sull'eziologia della Meningite cerebro-spinale epidemica (*Archivio per le scienze mediche*, XIII, n° 4, 1890).

(3) Jaeger, Zur Aetiologie des Meningitis cerebro-spinalis epidemica (*Zeitschr. für Hygiene*, 1895, XIX, p. 351).

(4) Pfeiffer, Voy. plus loin, p. 516.

(5) Von Ligelsheim, Berichte über die in der hygienischen Station zu Benthen vorgenomenen bakteriologischen Untersuchungen bisepidemischer Genickstarre (*Deutsche med. Wochenschr.*, 1905, nos 26-31).

En tenant compte des caractères exposés du *Méningocoque*, il est possible d'arriver à une différenciation, comme on s'en rendra compte à l'aide des courtes descriptions qui suivent.

DIPLOCOCCUS CRASSUS

Ce microbe a été rencontré par Jaeger, en 1895, dans une épidémie de méningite cérébro-spinale, et retrouvé l'année suivante à Berlin par Heubner (1) dans trois cas sur cinq de méningite cérébro-spinale, contre deux où se trouvait le *Méningocoque* vrai. Il a été regardé à ce moment par ces deux observateurs, et depuis par beaucoup d'autres, comme une simple variété du *Méningocoque* de Weichselbaum et tout à fait assimilé à lui sous le nom de *Méningocoque de Jaeger*.

Il est fréquent dans le liquide céphalo-rachidien ou dans les exsudats méningés dans les méningites, seul ou associé avec le *Méningocoque*, de même sur la muqueuse du rhino-pharynx.

Par sa *forme*, il ressemble beaucoup au *Méningocoque*. Les cocci sont peut-être un peu plus gros et ne s'assemblent pas en tétrades.

Les réactions de *coloration* présentent une différence capitale : il *reste toujours coloré par la méthode de Gram*.

Cultures. — Il pousse à partir de 20°; le *Méningocoque* ne commence faiblement qu'à 25°. Il croît sur les mêmes milieux que ce dernier. Sur gélose ordinaire, il végète d'abord mal, quoique mieux que le *Méningocoque*, puis s'habitue vite et donne des cultures abondantes. Les colonies sont plus petites, grisâtres à l'œil nu, brunâtres au microscope.

Fermentation des sucres. — Il fait fermenter le glucose et le maltose, comme le *Méningocoque*, mais aussi le lévulose, le saccharose, le lactose, que n'attaque pas ce dernier.

Agglutination. — Le sérum antiméningococcique l'agglutine constamment, même au taux élevé de 1 p. 200. Mais, comme l'ont bien montré Dopter et Koch, l'agglutination est due seulement, comme pour le *Gonocoque* (p. 511), à la présence des agglutinines secondaires, agglutinines de groupe. Cette agglutination baisse du reste graduellement avec la vie en cultures, pour tomber vite à des taux inférieurs.

Le sérum anti-crassus n'agglutine jamais le *Méningocoque*.

Fixation du complément. — Cette réaction est toujours négative.

La résistance de ce microbe aux conditions nocives, surtout à la dessiccation, est beaucoup plus grande que celle du *Méningocoque*. Il reste vivant et virulent très longtemps dans les liquides pathologiques ou les cultures.

Tous ces caractères montrent qu'il y a une différence bien nette entre le *Méningocoque* vrai et le *Méningocoque de Jaeger*, le *Diplococcus crassus* de Ligelsheim.

MICROCOCCUS CATARRHALIS (Voy. p. 516)

Il se trouve dans le mucus nasal et pharyngé, parfois dans des cas de méningite. Ce sont des diplocoques libres ou inclus dans les leucocytes,

(1) Heubner, Zur Aetiologie und Diagnose der epidemischen Cerebrospinalmeningitidis (*Deutsche med. Wochenschr.*, 1896, p. 423).

qui se *décolorent* par la méthode de Gram. Il pousse sur gélose ordinaire, mais mal ; bien sur gélose-ascite. Les colonies sont blanches, plus sèches et un peu plus petites que celles du *Méningocoque.*

Fermentation des sucres. — Il n'en fait fermenter aucun.

Agglutination. — Elle est toujours négative avec le sérum antiméningococcique.

STREPTOCOCCUS MUCOSUS

Ce microbe est en chaînettes plus ou moins longues, encapsulées. Il *reste coloré* par la méthode de Gram.

Il pousse mal sur gélose simple, très bien sur gélose-ascite. Les colonies sont transparentes comme du verre.

La morphologie le fait distinguer de suite du *Méningocoque.* Il n'est jamais agglutiné par le sérum antiméningococcique.

DIPLOCOCCUS MUCOSUS

Ce sont des diplocoques ou des tétrades, qui se *décolorent* par la méthode de Gram.

Il pousse très bien d'emblée sur gélose ordinaire, aussi sur gélose-ascite. Ce premier caractère suffit à le différencier.

Il n'est jamais agglutiné par le sérum antiméningococcique.

MICROCOCCUS CINEREUS

Ce sont des cocci isolés, en amas ou en diplocoques, se *décolorant* par la méthode de Gram.

Il pousse très bien sur gélose ordinaire, ce qui suffit à le différencier.

Il ne fait fermenter aucun sucre et n'est pas agglutiné par le sérum antiméningococcique.

DIPLOCOCCUS PHARYNGIS FLAVUS

Ce sont des diplocoques se *décolorant* par la méthode de Gram. Ils donnent sur gélose-ascite des colonies jaunâtres.

La fermentation des sucres est irrégulière. Ligelsheim décrit les types I, II et III, qui fermentent tous le glucose et le maltose, la plupart du temps le lévulose.

L'agglutination est nulle par le sérum antiméningococcique.

DIPLOCOCCUS PHARYNGIS SICCUS

Ce sont de petits diplocoques se *décolorant* par la méthode de Gram. Ils poussent bien sur gélose-ascite, où ils donnent de petites colonies sèches résistantes, qu'on ne peut absolument pas émulsionner dans un liquide. C'est une différence qu'il est facile de constater.

Tableau résumant les principaux caractères différentiels du Méningocoque *et des* Pseudo-méningocoques.

NOMS DES ESPÈCES.	RÉACTION à la méthode de Gram.	FERMENTATION DES SUCRES.			AGGLUTINATION.
		Glucose.	Maltose.	Lévulose.	
Méningocoque	—	+	+	0	+
Diplococcus crassus	+	+	+	+	+
Micrococcus catarrhalis	—	0	0	0	0
Streptococcus mucosus	—	»	»	»	0
Diplococcus mucosus	—	»	»	»	0
Diplococcus cinereus	—	0	0	0	0
Diplococcus pharyngis flavus I	—	+	+	+	0
Diplococcus pharyngis flavus II	—	+	+	+	0
Diplococcus pharyngis flavus III	—	+	+	0	0
Diplococcus siccus	—	+	+	+	0

Le microbe isolé par Still (1) dans une forme particulière de méningite des enfants de moins de deux ans, décrite par Gee et Barlow sous le nom de *simple posterior basic meningitis*, doit être identifié avec le *Méningocoque* vrai ; il en possède tous les caractères, ne présentant que des différences minimes (2). La grande efficacité du sérum antiméningococcique dans le traitement vient encore à l'appui de cette opinion.

Cohen (3) a signalé des cas de méningite dus à un coccobacille qui paraît identique au *Bacille de l'influenza* de Pfeiffer. Les trois malades ont présenté de la méningite, de la bronchopneumonie et des foyers multiples de suppuration, signes d'une véritable infection septicémique. La forme, les caractères de cultures du microbe rappellent en tout ceux du Bacille de Pfeiffer ; le pouvoir pathogène est beaucoup plus élevé ; il tue le lapin rapidement.

On a décrit sous le nom de *Maladie de Borna*, chez le cheval, une forme de méningite cérébro-spinale, caractérisée cliniquement par des accidents d'excitation cérébrale, avec contractures et paralysies.

Siedamgrotzky et Schlegel (4) ont isolé des centres nerveux un Microcoque leur paraissant spécial, ayant les cocci isolés, rarement en diplocoques, restant colorés par la méthode de Gram, se cultivant aisément sur tous les milieux ordinaires.

Ostertag (5) y trouve des diplocoques asymétriques, ressemblant au

(1) Still, The bacteriology of the simple posterior basic meningitis of infants (*Journ. of Pathol. and Bacter.*, 1898, p. 147).

(2) Wollstein, A comparative study of the Diplococci occurring in epidemic cerebro-spinal meningitis and posterior basic meningitis (*Journ. of experim. med.*, 1909, XI, n° 4).

(3) Cohen, La méningite cérébro-spinale septicémique (*Ann. de l'Inst. Pasteur*, XXIII, 1899, p. 273).

(4) Siedamgrotzky et Schlegel, Zur Kenntniss der seuchenartigen Cerebro-spinalmeningitis der Pferde (*Arch. für Thierheilkunde*, XXII, 1896, p. 286).

(5) Ostertag, Ueber die Borna'sche Krankheit (*Berl. thierärtzl. Wochenschr.*, 1900, p. 433).

Méningocoque, se décolorant par la méthode de Gram, mais se cultivant assez facilement sur tous les milieux.

On a rapproché sans preuves suffisantes ces microbes du *Méningocoque* ou de certains *Pseudo-méningocoques* et assimilé l'affection avec la maladie humaine. Il ne semble y avoir ici aucun rapport (1).

MICROCOCCUS CATARRHALIS R. PFEIFFER.

Kirchner (2) a signalé, en 1890, dans des crachats d'individus atteints de grippe, la présence de diplocoques se décolorant par la méthode de Gram. R. Pfeiffer a retrouvé ces mêmes microbes en 1896 dans des crachats de bronchopneumonie infantile et leur a attribué leur nom spécifique, en signalant leur aspect identique au *Gonocoque*.

Le *Micrococcus catarrhalis* a été retrouvé depuis par de nombreux observateurs, sur la muqueuse trachéale, chez des individus atteints d'affections inflammatoires de l'appareil respiratoire ou chez des individus sains. Ghon, H. Pfeiffer et Sederl (3), puis plus tard Bezançon et Israels de Jong (4) l'ont convenablement étudié.

MORPHOLOGIE

Caractères microscopiques et colorations. — Dans les crachats ou le mucus, après coloration, on trouve des diplocoques irréguliers, rappelant beaucoup le *Méningocoque* et le *Gonocoque*, inclus dans les leucocytes ou libres dans le milieu. La préparation de crachats purulents peut rappeler absolument celle de pus urétral ou d'exsudat méningé. Les éléments paraissent un peu plus gros que ceux du *Gonocoque*. Ils ont de 1,5 à 2 μ de long, sur 1 μ de large. Ils ne montrent pas de capsules, parfois une minime auréole (Bezançon). D'après Ghon et Pfeiffer, la disposition en tétrades serait fréquente, rare d'après Bezançon. On ne voit jamais de chaînettes.

Dans les cultures, les éléments sont un peu plus gros et plus irréguliers. Certains éléments sont très gros. Il n'y a jamais de chaînettes, même dans les liquides.

Les éléments sont toujours immobiles et ne forment jamais de spores. Ils se colorent bien aux méthodes ordinaires et se *décolorent* toujours par la méthode de Gram.

Cultures. — Le *Micrococcus catarrhalis* pousse à la température de 20° environ et a un optimum vers 37°.

Sur *gélose ordinaire*, il donne après vingt-quatre heures de petites colonies d'un blanc grisâtre, arrondies. Après trois ou quatre jours, à un faible grossissement, on leur trouve une partie centrale surélevée, brunâtre, et des bords irréguliers, granuleux, frangés. Elles sont assez épaisses, adhérentes à la gélose. L'addition de glucose ou de saccharose

(1) MARCQ, Recherches sur la méningite cérébro-spinale du cheval (*Ann. de méd. vétér.*, janvier 1909).

(2) KIRCHNER, Bakteriologische Untersuchungen über Influenza (*Zeitschr. für Hygiene*, 1890, IX, p. 528).

(3) GHON, H. PFEIFFER et SEDERL, Der Mikrokokkus catarrhalis als Krankheitserreger (*Zeitschr. für klin. Med.*, 1902, XL).

(4) BEZANÇON et ISRAELS DE JONG, Le Micrococcus catarrhalis (*Presse méd.*, 1905, n° 82).

est favorable. Ces cultures perdent vite leur vitalité ; il faut les réensemencer au bout de trois ou quatre jours.

Sur *gélose-ascite*, ou gélose au sérum ou au sang, le développement est bien meilleur. La vitalité s'y conserve des semaines.

Sur *gélatine*, le microbe pousse lentement, sans liquéfier.

Sur *pomme de terre*, il se développe mal, en donnant une très minime culture.

Dans le *bouillon*, le développement se fait bien, il se produit un trouble et un dépôt assez abondant, ou un léger voile, d'après Ghon et Pfeiffer.

Dans le *sérum liquide*, le développement est faible. Le microbe n'a pas de capsule.

Le *lait* n'est pas coagulé ; le microbe y pousse bien.

PROPRIÉTÉS BIOLOGIQUES

La vitalité se perd assez vite dans les milieux ordinaires ; dans les milieux au sang ou aux sérosités, elle se garde au contraire longtemps.

Le microbe pourrait résister longtemps à la dessiccation.

Il ne forme pas d'indol.

Il ne fait *fermenter aucun sucre*. Il ne modifie pas les milieux tournesolés, ne produit pas de changement de teinte dans le bouillon-ascite glucosé ou maltosé à 1 p. 100, additionné de rouge neutre (p. 507).

Des produits toxiques ne sont pas connus. Les cultures filtrées n'ont aucun effet.

INOCULATION EXPÉRIMENTALE

Le *Micrococcus catarrhalis* paraît être très peu virulent pour la souris, le cobaye et le lapin. Les souris et cobayes ne succombent qu'à des injections intrapéritonéales de doses massives de cultures.

HABITAT ET ROLE ÉTIOLOGIQUE

Ce microbe n'a pas encore été rencontré dans le milieu extérieur.

Il paraît commun sur la muqueuse trachéale saine, dans le mucus nasal des individus sains, en dehors de tout cas de méningite.

Il est très fréquent dans la bronchite aiguë, les pneumonies, la broncho-pneumonie infantile, dans les crachats de coqueluche, de rougeole, de diphtérie, de scarlatine ; très fréquent dans les crachats de grippe.

Dans ces cas, il est rarement seul, le plus souvent associé à d'autres microbes, surtout le *Pneumocoque* et le *Bacille de Pfeiffer*.

Son rôle est encore bien douteux. C'est peut-être un simple saprophyte ; ou bien il agit en association.

RECHERCHE ET DIAGNOSTIC

C'est surtout important pour le *Méningocoque* (Voy. p. 513) ou le *Gonocoque* (Voy. p. 533). Ces trois espèces ont en effet de grands rapports entre elles. Elles paraissent cependant devoir être nettement distinguées.

MIÇROCOCCUS GONORRHEÆ Neisser.

(*Gonococcus*, *Gonocoque*.)

Atlas de microbiologie, pl. xx.

Hallier (1) avait signalé, en 1872, la présence de *Micrococcus* dans le pus de la blennorragie, et reconnu qu'on pouvait les rencontrer dans l'intérieur des globules du pus. Les premières recherches précises sont de Neisser (2), qui a démontré la constance du microbe qu'il a appelé *Gonococcus* dans la blennorragie et l'ophtalmie blennorragique. Les observations de Weiss (3) ont confirmé celles de Neisser et y ont ajouté des considérations cliniques intéressantes. Les travaux les plus importants sur ce sujet sont sans contredit ceux de Bumm (4), qui a obtenu des résultats bien supérieurs aux précédents; Legrain (5), dans un travail fait à mon laboratoire, a mis en lumière des faits nouveaux d'un grand intérêt.

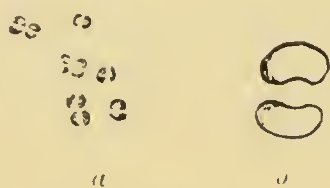


Fig. 226. — *Micrococcus gonorrheæ*, d'après Bumm : *a*, éléments pris dans une culture, 1200/1 ; *b*, forme schématique d'un couple.

Ce *Micrococcus* n'est cependant pas la seule espèce que l'on rencontre dans le pus blennorragique. Zeissl (6) en a signalé plusieurs autres, différents d'aspect; Bumm (7) en a isolé, qui seront décrits plus loin ; après lui, Giovannini (8) en a cru distinguer cinq espèces, dont deux seulement existeraient dans l'urètre normal. Les caractères de formes et de dimensions de ces *Micrococcus* sont très semblables ; aussi ne peut-on guère songer à les différencier que par les cultures. Legrain a obtenu du pus des écoulements urétraux quinze espèces de Bactéries, Microcoques ou Bacilles, dont plusieurs ont des caractères morphologiques voisins de ceux du *Gonocoque de Neisser*. Deux caractères semblent cependant, jusqu'ici, propres au *Micrococcus gonorrheæ* : sa présence, dans une certaine mesure, à l'intérieur des cellules et surtout des globules du pus, et sa décoloration constante par la méthode de Gram, signalée par G. Roux (9).

MORPHOLOGIE

Caractères microscopiques. — Les coccus ont un diamètre moyen de 0,5 μ, qui semble un peu diminuer dans les cas chroniques ; d'autres

(1) Hallier, *Zeitschr. für Parasitenkunde*, I, p. 179.

(2) Neisser, Ueber ein der Gonorrheæ eigenthümliche Micrococcenform (*Centralbl. für die med. Wissensch.*, 1879).

(3) Weiss, Le Microbe du pus blennorragique. Thèse de Nancy, 1880.

(4) Bumm, Der Mikroorganismus der gonorrheischen Schleimhaut Erkrankungen. Wiesbaden, 1885.

(5) Legrain, Les Microbes des écoulements de l'urètre. Thèse de Nancy, 1888.

(6) Zeissl, Ueber den Diplococcus Neisser's (*Vierteljahrsschr. für Derm.*, 1887).

(7) Bumm, Beitrag zur Kenntniss der Gonorrheæ der weiblichen Genitalien (*Arch. für Gynæk.*, XXIII, 1884, p. 327).

(8) Giovannini, Die Mikroparasiten der männlichen Harnröhrentrippers (*Centralbl., für die med. Wissensch.*, 1886, p. 365).

(9) G. Roux, Procédé technique de diagnose des *Gonococci* (*C. R. de l'Acad. des sc.* 8 novembre 1886).

fois, ils atteignent 1 μ. Ils sont d'habitude réunis par couples, en diplocoques, associés fréquemment en petits amas, jamais en chaînettes. Leur forme est ovale; elle apparaît nettement asymétrique à un fort grossissement (fig. 226). L'une des grandes faces des coccus, celle qui est tournée vers le centre du couple dans le diplocoque, est aplatie et légèrement creusée (fig. 226, *b*); l'élément prend alors l'aspect réniforme, celui d'un haricot. Les contours sont même souvent irréguliers; on peut retrouver la forme de cubes à coins arrondis, signalée par Christmas (1). Dans les cultures, les variations sont encore plus grandes, comme l'indiquent Wertheim (2) et Fonseca (3): les grains, très inégaux, sont petits et arrondis, ou plus gros, en forme d'ellipses ou de courts bâtonnets à extrémités arrondies. D'après quelques auteurs, les éléments des couples seraient réunis par une sorte de gangue gélatineuse ou muqueuse rappelant les capsules d'autres microbes. Ils possèdent, dans les cultures, un mouvement bien évident, mais peu prononcé. Legrain leur décrit même trois sortes de mouvements distincts : un mouvement lent de translation du couple, un mouvement d'oscillation des couples sur eux-mêmes, un mouvement de rotation propre à chacun des éléments d'un couple. Moore (4) aurait aussi bien constaté cette mobilité dans le pus blennorragique étendu de solution salée physiologique que dans les cultures sur divers milieux.

Coloration. — Les *Gonocoques* se colorent très bien à l'aide des solutions de couleurs d'aniline ordinairement employées; ils prennent même la couleur d'une façon intense. La fuchsine de Ziehl, le violet ou la thionine phéniqués, réussissent particulièrement bien.

Ils se *décolorent toujours* par la méthode de Gram, caractère important pour la diagnose qu'a le premier signalé G. Roux (5); cette décoloration est rapide, il faut faire agir l'alcool rapidement. Toutefois, d'après Weinrich (6), pour être bien sûr du résultat produit, il est nécessaire d'éviter le contact de l'eau. Les préparations, colorées par un séjour de quelques minutes dans la solution de violet, sont portées, *sans être lavées à l'eau*, dans la solution iodo-iodurée où elles sont laissées trois minutes, puis directement dans l'alcool absolu (maintenu absolu par du sulfate de cuivre anhydre) pendant une minute à une minute et demie, jusqu'à ce que l'alcool n'enlève plus de couleur; alors seulement on lave à l'eau et l'on peut recolorer à la vésuvine. Un séjour de moins de trente secondes dans l'alcool absolu pourrait, selon Bergh (7), laisser colorés les Gonocoques inclus dans les cellules. En opérant comme il vient d'être exposé, on peut tenir pour sûrs les résultats obtenus.

(1) Christmas, Le Gonocoque et sa toxine (*Ann. de l'Inst. Pasteur*, XI, 1897, p. 609).
(2) Wertheim, Reinzüchtung der Gonokokken durch Plattenverfahrens (*Deutsche med. Wochenschr.*, 1891, n° 50).
(3) Fonseca, Le Gonocoque; morphologie, réactions colorantes, inoculations (*Soc. de Biol.*, 16 juillet 1898).
(4) Moore, Demonstration von Gonokokken-Bewegung (*Berl. klin. Wochenschr.*, 1895, p. 112).
(5) G. Roux, Procédé technique de diagnose des *Gonococci* (*C. R. de l'Acad. des sc.*, 8 novembre 1886).
(6) Weinrich, Die Färbarkeit des Gonococcus (*Centralbl. für Bakt.*, XXIV, 1898, p. 258).
(7) Himan van der Bergh, Ueber das Verhalten des Gonokokkus zur Grams'chen Färbemethode (*Centralbl. für Bakt.*, XX, 1896, p. 785).

En se basant sur cette propriété de se décolorer au Gram, il est possible d'obtenir une double coloration précieuse dans les préparations qui contiennent ce microbe et d'autres éléments. En colorant d'abord au violet, décolorant par la méthode de Gram et faisant agir un bain d'autre nuance, un bain d'éosine comme le fait G. Roux, ou un bain aqueux de vésuvine comme le recommande Steinschneider (1), on voit les Gonocoques teints en rose d'éosine ou en brun, alors que d'autres espèces qui peuvent se trouver avec eux ou des éléments du produit employé ont gardé la teinte violette du premier bain.

Pour le pus blennorragique, Lanz (2) recommande l'emploi d'un mélange fraîchement préparé de quatre parties de solution de thionine et d'une de fuchsine additionné d'un peu de solution phéniquée. Les Gonocoques se coloreraient en bleu, le protoplasma cellulaire en rouge, les noyaux en l'une ou l'autre nuance.

Le *rouge neutre* (*Neutralroth*) a été très vanté par Plato, comme colorant vital, pour l'étude du Gonocoque dans le pus blennorragique. D'après lui, se coloreraient seules, avec ce réactif, les substances incluses qui auraient subi l'action de désintégration cellulaire. La solution colorante employée est formée de 1 centimètre cube de solution aqueuse de rouge neutre saturée à froid, que l'on ajoute à 100 centimètres cubes de solution physiologique. Dans le pus frais, seuls se colorent les Gonocoques intracellulaires; les Gonocoques extracellulaires, les microbes associés, les leucocytes sains restent incolores. La coloration se fait extemporanément et ne se conserve pas. Pour Himmel (3), la coloration dépend des propriétés oxydantes des leucocytes et se fait sur toutes les substances phagocytées; elle tient à la production d'une substance acide par le leucocyte; lors de la mort de celui-ci, le milieu se neutralise et la coloration disparaît : la coloration par le rouge neutre des Gonocoques vivants ou morts, englobés ou non par les phagocytes, ne diffère en rien de la coloration d'autres microbes. Le rouge neutre ne pourrait donc pas servir de moyen de diagnostic spécial.

Wahl (4) recommande le mélange suivant :

Solution alcoolique concentrée d'auramine	2	cent. cubes.
Alcool à 95°	1,5	—
Solution alcoolique concentrée de thionine..........	2	—
Solution aqueuse concentrée de vert de méthyle....	3	—
Eau	6	—

Les solutions alcooliques concentrées sont préparées avec de l'alcool à 95°, que l'on chauffe à la flamme avec un excès de matière colorante; on filtre après complet refroidissement.

La coloration se fait pendant cinq à quinze secondes. Les Gonocoques sont colorés en rouge violet foncé, presque noir; les noyaux des leuco-

(1) Steinschneider, Zur Differenzirung der Gonokokken (*Berl. klin. Wochenschr.*, 1890, p. 533).

(2) Lanz, Ueber die Färbung des Tripperseketes mit Anilinfarbengemischen (*Deutsche med. Wochenschr.*, 1898, n° 40).

(3) Himmel, Le rouge neutre (*Neutralroth*); son rôle dans l'étude de la phagocytose en général et dans celle de la blennorragie en particulier (*Ann. de l'Inst. Pasteur*, XVI, 1902, p. 663).

(4) Wahl, Zur Gonokokkenfärbung (*Centralbl. für Bakt.*, XXXIII, Originale, 1903, p. 239).

cytes sont d'un bleu verdâtre pâle; le protoplasma est incolore ou jaunâtre; les cellules épithéliales sont d'un jaune verdâtre; les autres Bactéries de l'urètre sont incolores ou faiblement colorées.

La gangue qui retient les coccus en couples se colorerait parfois légèrement par la solution de Ziehl. Elle est parfois plus développée et forme comme une petite capsule.

Rapports du Gonocoque avec les éléments du pus blennorragique. — Il est à recommander, pour conserver le plus possible dans les préparations les rapports qui existent entre ces éléments du pus, de ne pas frotter deux lamelles l'une contre l'autre pour étendre la couche à colorer. Il faut étaler le pus sur la lamelle, puis la faire sécher; on évite ainsi de briser les globules de pus et de disperser les Bactéries dans le liquide. En opérant avec des précautions, on ne trouve, pendant la période d'état, que de très rares Micrococques dans le liquide. Et encore ce sont peut-être des Bactéries accessoires qui accompagnent souvent cette espèce; les *Micrococcus gonorrheæ* sont localisés dans l'intérieur des cellules.

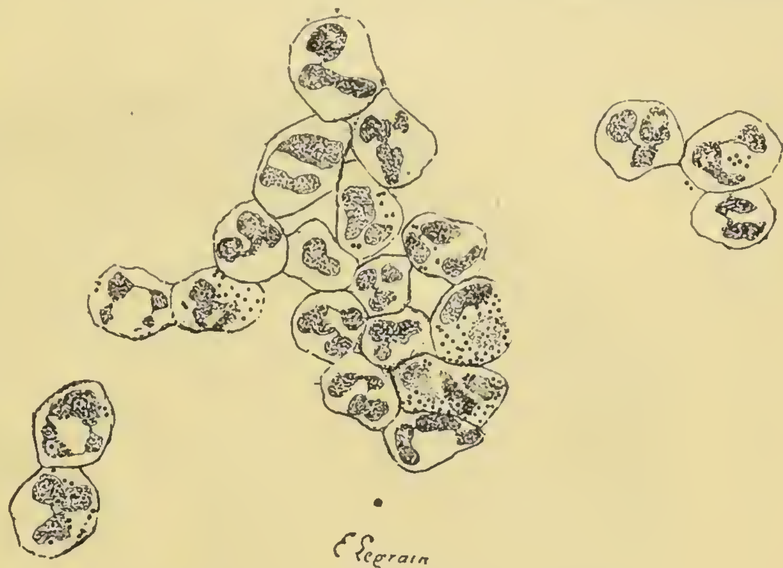


Fig. 227. — Blennorragie aiguë. Deuxième jour de l'écoulement. 600/1.

Le nombre des individus de *Micrococcus gonorrheæ* qui se trouvent dans le pus blennorragique, et les rapports qu'ils affectent avec les éléments cellulaires que ce liquide tient en suspension, varient dans de larges limites, suivant l'âge et la nature de l'écoulement. E. Legrain (1) a donné de très intéressants détails à ce sujet.

Au début, on trouve dans le pus beaucoup de cellules épithéliales parmi les globules de pus; 2 ou 3 p. 100 de ces derniers seulement contiennent des Gonocoques. Dès la fin du second jour, la proportion des globules de pus contenant des Bactéries augmente un peu; certains en contiennent parfois un grand nombre, de dix à quatre-vingts ordinairement, jusqu'à cent vingt d'après Bouchard (fig. 227 et 228). La période aiguë s'accentue; les cellules épithéliales disparaissent presque complètement. Le nombre des globules de pus envahis augmente beaucoup (un sur cinq ou six). A ce moment, le parasite ne prolifère plus dans l'épithélium, mais dans l'épaisseur de la muqueuse; c'est pourquoi il est si difficile à atteindre. A la période subaiguë, les éléments épithéliaux redeviennent nombreux, mais présentent rarement des *Gonocoques*; les globules de pus envahis sont, au contraire, en grand nombre (fig. 228). Enfin, quand l'écoulement passe à l'état chronique, la proportion des globules de pus se réduit beaucoup; il est souvent difficile de trouver un globule

(1) E. Legrain, Recherches sur les rapports qu'affecte le *Gonococcus* avec les éléments du pus blennorragique (*Arch. de physiol.*, 1887, n° 6).

de pus au milieu des éléments épithéliaux. Mais presque toutes les cellules épithéliales sont attaquées par la Bactérie ; certaines peuvent en contenir un nombre considérable (cent à cent vingt) ; le liquide en renferme un grand nombre; très peu se trouvent dans les globules de pus. Dans un cas de rechute, au bout de cinq mois les globules de pus avaient reparu dans l'écoulement, en grande quantité; aucun ne contenait de Gonocoques; les cellules épithéliales en étaient par contre surchargées. L'inflammation a quitté la profondeur pour revenir superficielle et ne se produit plus avec les mêmes caractères qu'à l'état aigu. Ces résultats sont d'une très grande importance en thérapeutique. Ils confirment, en

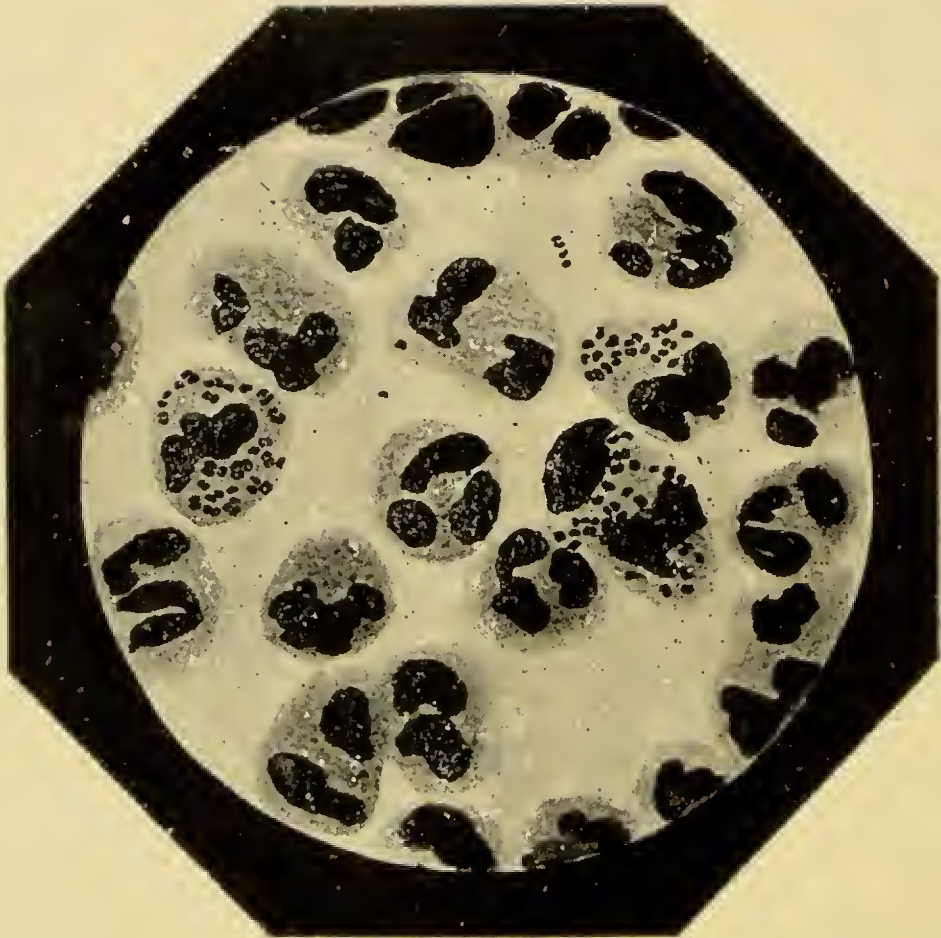


Fig. 228. — Pus blennorragique (d'après une photographie). 1200/1.

effet, la règle de conduite à recommander : employer un antiseptique énergique au début, ou seulement après la période aiguë, quand le parasite, revenu à la surface, est facile à atteindre.

Cultures. — Le *Gonocoque* est strictement aérobie; il ne végète pas du tout en l'absence d'oxygène. Il ne se développe qu'à partir de 22° environ et présente son optimum vers 37° ; à 40°, on n'obtient plus rien.

Il est facilement tué par des températures inférieures, même peu basses, en peu de temps à 10°, même 15°. Aussi est-il à recommander, lorsqu'on veut obtenir des cultures, d'ensemencer les milieux directement avec le porteur, au laboratoire même si c'est possible, et de mettre immédiatement à l'étuve. Quand l'ensemencement est fait à grande distance et que les milieux sont transportés à la température ordinaire, les résultats peuvent être très souvent négatifs.

Il est à recommander avant tout, pour avoir des cultures pures, de prendre le pus des premiers jours; plus tard, les cultures sont envahies

par les Bactéries accessoires dont nous avons parlé. De plus, fait important, plus on se rapproche du début de l'écoulement, plus les cultures s'obtiennent facilement et montrent de vitalité.

Lorsqu'on met en culture du pus de la deuxième ou troisième semaine, les colonies obtenues sont bien plus réduites et souvent incapables de se reproduire en seconde culture.

A plus forte raison n'obtient-on rien en ensemençant des pus recueillis au loin et ayant subi des transports, ni surtout des pus desséchés.

Pour ensemencer dans les meilleures conditions, il faut prendre du pus urétral recueilli de la façon suivante. Le méat urinaire est soigneusement lavé à plusieurs reprises, avec de l'eau bouillie tiède, puis rigoureusement essuyé avec du coton stérilisé. On fait sourdre, par pression le long du canal, une gouttelette d'exsudat qu'on recueille avec une öse stérilisée et étend ensuite largement sur le milieu choisi.

Tous les milieux sont loin de convenir pour la culture du *Gonocoque*; il présente au contraire des exigences spéciales. Avec les milieux ordinaires, on n'obtient très souvent rien en partant directement du pus. Lorsque le microbe y cultive, c'est faiblement; dans les cas positifs, il ne s'y conserve pas ou peu, les ensemencements ultérieurs restent bien souvent stériles. Le *Gonocoque* demande des milieux renfermant de l'albumine naturelle, et surtout, semble-t-il, de l'albumine d'origine humaine. Mais alors, quand il a été cultivé pendant quelques générations sur de tels milieux, il s'habitue, s'accoutume en quelque sorte à la vie saprophytaire et peut facilement se cultiver indéfiniment sur les milieux ordinaires.

La réaction du milieu peut influer. Malgré des divergences d'opinion, on doit prendre des milieux neutres ou, mieux encore, à réaction légèrement alcaline au tournesol. Les milieux trop alcalins ne donnent rien.

Bumm, le premier, a réussi à cultiver ce microbe sur du sérum de sang humain, obtenu comme il a été indiqué précédemment (p. 238) et maintenu de 33° à 37°.

Bockart (1), Kreiss (2), Legrain en ont obtenu les premiers des cultures sur gélatine et gélose.

Cultures sur milieux solides. — Le milieu de choix est la *gélose-ascite*, préparée comme il a été dit pour la culture du *Méningocoque* (p. 497.) Dès vingt-quatre heures à 37°, le *Gonocoque* y donne des colonies arrondies, punctiformes, assez transparentes, d'un blanc grisâtre, à bords légèrement sinueux à un faible grossissement. Ces colonies s'étendent un peu et peuvent atteindre 1 millimètre de diamètre vers le troisième ou quatrième jour. Leur partie centrale est alors assez épaisse, blanchâtre, les bords transparents et sinueux. Elles sont assez visqueuses, se séparent un peu difficilement du milieu, et s'émulsionnent beaucoup moins bien que les colonies de *Méningocoque*.

Sur ce milieu, les cultures peuvent se repiquer indéfiniment avec succès.

(1) Bockart, Beiträge zur Kenntniss der Gonococcus (*Monatshefte für prakt. Derm.*, V, 1886, n° 10).

(2) Kreiss, Beiträge zur Kenntniss der Gonococcus (*Wiener med. Wochenschr.*, 1885, n° 30).

Au lieu de liquide d'ascite, on peut utiliser d'autres sérosités humaines, des liquides de pleurésie, d'hydrocèle, du sérum de sang humain, voire même d'autres sérums, au besoin du vieux sérum antidiphtérique. Il est bon, lorsque ces liquides ont été recueillis stériles et doivent être employés directement en mélange avec la gélose, de les chauffer au préalable à 60° pendant une demi-heure pour leur enlever toute action bactéricide.

On peut aussi employer d'autres matières albuminoïdes, comme on le verra dans l'exposé des procédés suivants qui ont été vantés comme donnant de bons résultats.

Méthode de Bumm. — Bumm s'est servi de sérum humain (p. 238). D'après lui, la culture apparaît sur ce milieu de dix-huit à vingt-quatre heures après l'ensemencement ; la croissance est lente et s'arrête au bout de quelques jours. Après entier développement, elle forme un îlot à bords escarpés, à surface humide et brillante, ressemblant à une mince couche de vernis. Cette culture sur sérum, grisâtre, presque transparente, à surface lisse, ne dépasse pas 1 ou 2 millimètres de largeur.

Méthode de Wertheim. — D'après Wertheim (1), le *Gonocoque* se développerait aussi bien, sinon mieux, sur un milieu formé à parties égales de sérum humain et de gélose peptonisée à 2 p. 100. En étuve, vers 36°, on obtient des colonies semblables à celles développées sur sérum humain. Kiefer (2) a remplacé, sans remarquer de différence dans les cultures, le sérum humain par du liquide ascitique, beaucoup plus facile à obtenir ; c'est le milieu qui est recommandé aujourd'hui ; il recommande de prendre, pour le mélange, de la gélose glycérinée contenant 5 p. 100 de peptones.

Kral (3) dit avoir obtenu de bons résultats en remplaçant, dans le milieu de Wertheim, le sérum humain par du sérum du sang de veau.

Méthode de Christmas. — Christmas (4) trouve très avantageux, surtout pour obtenir des premières cultures, de se servir de sérum de lapin coagulé. Il suffit souvent de douze heures à l'étuve, à 36°, pour voir le sérum se couvrir de petites colonies transparentes qu'il est facile de repiquer.

Ces colonies sont diaphanes, à contours arrondis mais irréguliers, à centre un peu surélevé ; elles sont très visqueuses.

Comme on n'obtient que peu de ce sérum, on peut se servir, pour le coaguler, de tubes de petit diamètre ; les résultats sont aussi bons.

Méthode de Wassermann. — Wassermann (5) recommande l'usage d'un milieu préparé de la façon suivante : 15 centimètres cubes de sérum de porc, le plus possible privé d'hémoglobine, sont mis dans un flacon d'Erlenmeyer, puis étendus de 30 à 35 centimètres cubes d'eau ; on ajoute ensuite 2 à 3 centimètres cubes de glycérine et, en dernier, 0gr,8 (2 p. 100) de nutrose. On agite pour bien mélanger et l'on fait bouillir à feu nu,

(1) Wertheim, Zur Lehre von Gonorrhœ (*Prag. med. Wochenschr.*, 1891).

(2) Kiefer, Zur Kultur des Gonococcus Neisser (*Berl. klin. Wochenschr.*, 1895, p. 332).

(3) Kral, Eine einfache Methode zur Isolierung des Gonococcus (*Arch. für Derm.*, XXVIII, 1894).

(4) Christmas, Le Gonocoque et sa toxine (*Ann. de l'Inst. Pasteur*, XI, 1897, p. 613).

(5) Wassermann, Ueber Gonokokkencultur und Gonokokkengift (*Berlin. klin. Wochenschr.*, 1897, n° 32, p. 685). — Id., Weitere Mittheilungen über Gonokkokencultur und Gonokokkengift (*Zeitschr. für Hygiene*, XXVII, 1898, p. 298).

sur un bec Bunsen, en agitant constamment. Le liquide s'éclaircit par l'ébullition et est ensuite stérilisé dans la vapeur, par le procédé ordinaire. L'addition de nutrose, mélange de caséine et de phosphate de soude, empêche la coagulation du sérum. Le milieu peut être employé liquide, ou additionné de gélose. On ajoute alors au produit la valeur de six à huit tubes de gélose peptonisée à 2 p. 100 maintenue liquide vers 50°; on mélange, on coule dans des boîtes de Petri stérilisées et on laisse prendre par refroidissement.

On ensemence en strie à la surface et l'on met à l'étuve. Au bout de vingt à vingt-quatre heures, on voit se développer un plus ou moins grand nombre de petites colonies grisâtres, semblables à des gouttes de rosée, qui grandissent et, après vingt-quatre heures, ont les dimensions d'une petite tête d'épingle.

Méthode de Heiman. — Heiman (1) dit grand bien d'un milieu formé du mélange à deux tiers de gélose peptonisée à 1 p. 100 maintenue liquide, à 40°, de un tiers de sérum de pleurésie, stérilisé d'avance par chauffages répétés entre 65° et 70°. Le mélange doit être neutre ; si le sérum était alcalin, il faudrait employer une gélose légèrement acide.

Méthode de Wildbolz. — Wildbolz (2) se sert d'une gélose additionnée de 5 p. 100 de *pseudo-mucine*, matière albuminoïde obtenue en précipitant par l'alcool le liquide de kystes ovariens, séchant et pulvérisant. Les colonies obtenues sur ce milieu pourraient présenter un aspect opaque et blanchâtre.

Méthode de Lipschütz. — Lipschütz (3) utilise de la poudre d'albumine d'œufs qui se trouve dans le commerce. Cette poudre est dissoute en proportion de 2 p. 100 dans de l'eau ordinaire; on ajoute au liquide 20 p. 100 de solution de soude caustique au dixième : on filtre sur papier et répartit le liquide jaunâtre, alcalin au tournesol, dans des ballons par quantités de 30 à 50 centimètres cubes. C'est ce liquide qu'on mélange à la gélose en proportion de 1 partie pour 2 ou 3 de gélose.

Le *Gonocoque* se cultive très bien sur ce milieu facile à préparer.

Gélose au sang. — On peut obtenir aussi de bons résultats en étendant simplement à la surface de gélose, à l'aide d'une öse de platine, quelques gouttes de sang humain frais et recueilli aseptiquement, selon la méthode de Pfeiffer (*gélose sanglante*) ; ou en se servant de la gélose au sang de Bezançon et Griffon (p. 249).

Gélose à l'urine. — Steinschneider (4), puis Finger, Ghon et Schlagenhaufer (5) recommandent l'emploi de milieux à base d'urine (parties égales d'urine humaine et de gélose peptonisée ou une partie d'urine et deux parties de gélose).

(1) Heiman, A clinical and bacteriological Study of the Gonococcus (*New York Med. Record*, 22 juin 1895). — Id., A further Study of the biologie of the Gonococcus (*New York med. Record*, 19 décembre 1896).

(2) Wildbolz, Bacteriologische Studien über Gonokokkus (*Arch. für Dermat.*, 1903, LXIV, p. 225).

(3) Lipschütz, Ueber einen einfachen Gonokokkennährboden (*Centralbl. für Bakt.*, Orig., XXXVI, 1904, p. 743).

(4) Steinschneider, Biologie der Gonokokken (*Berlin. klin. Wochenschr.*, 1895, p. 984).

(5) Finger, Ghon et Schlagenhaufer, Beiträge zur Biologie des Gonococcus (*Centralbl. für Bakt.*, XVI, 1894, p. 350).

Hammer (1) dit avoir obtenu de meilleurs résultats en employant de l'urine fortement albumineuse que l'on peut stériliser par chauffages répétés ou par filtration.

Gélose de Thalmann. — D'après Thalmann (2), on obtient en quinze heures, à 37°, des colonies bien visibles sur de la gélose faite avec de la macération de viande dont on a seulement neutralisé 70 p. 100 de l'acidité totale. L'ensemencement de pus blennorragique y réussirait toujours, mais les réensemencements seraient le plus souvent négatifs.

Gélose de Steinschneider. — Steinschneider (3) donne comme très favorable l'addition de jaune d'œuf à la gélose. Un jaune d'œuf est mélangé avec trois fois son poids d'eau stérilisée ; on agite fortement pour bien mélanger. A 20 grammes du produit, on ajoute 10 grammes d'une solution de phosphate de soude à 20 p. 100, puis trois fois le volume, c'est-à-dire environ 90 grammes, de gélose à 3 p. 100; on répartit en tubes et laisse solidifier.

Les colonies sont bien visibles après un jour ou deux de séjour à l'étuve.

Méthode de Patellani. — Patellani (4) dit obtenir facilement des cultures sur gélose faite avec des masses musculaires de fœtus; en ajoutant à ce milieu de l'urine de fœtus et du liquide amniotique, les résultats sont encore meilleurs.

En somme, le procédé à suivre est certainement l'emploi de la gélose-ascite ou des succédanés cités plus haut. Il est cependant intéressant de signaler les résultats obtenus par Legrain, principalement sur les gélatine et gélose ordinaires.

Cultures sur gélatine. — Par inoculation en *piqûre* dans un tube de gélatine à 15 p. 100, on observe au bout de quelques jours, en maintenant la culture à 22°, une légère dépression à la surface. Vers le dixième jour, il s'est formé une cupule d'environ 1 centimètre de haut, constituée plutôt par un ramollissement de la gélatine que par une liquéfaction véritable. Ces cultures sont très peu résistantes et ne se reproduisent que difficilement par ensemencement.

Turro (5) recommande de prendre de la gélatine acide, de beaucoup préférable au milieu neutre ou faiblement alcalin. On l'obtient d'une acidité suffisante en n'ajoutant pas d'alcali au mélange de gélatine et de peptones. Les colonies y seraient plus blanches et ne liquéfieraient pas la gelée.

Cultures sur gélose ordinaire. — En inoculant en *strie* un tube de gélose avec une petite quantité de pus et en le maintenant à 35°, on voit, après la vingtième heure, la gouttelette de pus devenir friable; les globules de pus et les cellules épithéliales subissent une désagrégation; les premiers contiennent presque tous des *Gonocoques* qui ont déjà pullulé. Ce n'est bientôt plus qu'un magma granuleux, parsemé de

(1) Hammer, Beiträge zur Kultur des Gonococcus (*Deutsche med. Wochenschr.*, 1895, p. 859).

(2) Thalmann, Züchtung der Gonokokken auf einfachen Nährboden (*Centralbl. für Bakt.*, XXVII, 1900, p. 828).

(3) Steinschneider, Eidotteragar, ein Gonokokkennährboden (*Berl. klin. Wochenschr.*, 1897, n° 18).

(4) Patellani, *Annali di ostetrica e ginecologia,* 1901, n° 1.

(5) Turro, Gonokokkenzüchtung und künstlicher Tripper (*Centralbl. für Bakt.*, XVI, 1894, p. 17).

Microcoques. Il se forme autour, vers la trentième heure, une auréole mince, claire, transparente, qui s'élargit et atteint 3 à 4 millimètres à la fin du troisième jour. Au dixième jour, la culture mesure 1 centimètre de long environ; elle a un aspect vernissé, luisant, plutôt sec qu'humide. Au bout de trois semaines, elle atteint 3 centimètres et montre sur ses bords de petits mamelons transparents; puis elle reste stationnaire, se dessèche et se fendille. Cette culture n'est pas visqueuse, mais granuleuse et friable. Sa vitalité diminue assez rapidement; on n'obtient plus rien de la quatrième culture.

Cultures sur pomme de terre. — On n'observe aucun développement.

Cultures en milieux liquides. — Dans le bouillon peptonisé ordinaire, Legrain a obtenu une culture minime, un louche très peu intense, à peine visible, vers la fin du second jour à 37°; puis tout s'arrête, le liquide s'éclaircit et il se forme un très fin dépôt grisâtre au fond du tube.

Thalmann dit que les cultures se font facilement dans la macération de viande dont on a neutralisé 70 p. 100 de l'acidité totale. Les réensemencements réussissent bien sur ce milieu.

Mais le milieu liquide de choix est le *bouillon-ascite* obtenu en mélangeant 1 partie de liquide d'ascite avec 3 parties de bouillon peptonisé ordinaire. On peut remplacer le liquide d'ascite par des succédanés, comme pour la gélose-ascite (Voy. p. 497). Le liquide ensemencé se trouble entièrement et laisse peu à peu déposer des flocons d'un blanc grisâtre.

Christmas recommande, lorsqu'on veut obtenir de grandes quantités de culture, de se servir d'abord du mélange de 1 partie de liquide d'ascite avec 3 de bouillon; après accoutumance au milieu, on peut graduellement augmenter la proportion de sérosité ascitique et arriver jusqu'à 3 parties de liquide d'ascite pour 1 partie de bouillon, milieu qui serait, selon lui, très favorable à la production de toxine. La réaction doit être très légèrement alcaline: si elle l'était trop, il faudrait la réduire avec l'acide lactique.

Dans ce milieu, à 37°, le trouble est déjà bien visible en douze heures; après deux, trois jours, il s'est formé un léger voile incomplet, crémeux, qui laisse tomber de longs filaments. Au bout de sept à huit jours, le liquide s'éclaircit; on trouve au fond un dépôt blanchâtre, visqueux, épais, très adhérent au vase.

Après un certain nombre de générations en bouillons spéciaux, le *Gonocoque* pousse facilement en bouillon ordinaire et peut s'y repiquer indéfiniment avec succès.

PROPRIÉTÉS BIOLOGIQUES

Vitalité. — Le *Gonocoque* résiste excessivement peu aux conditions défavorables. L'exposition à une température de 0°, pendant quelques heures, de tubes convenablement ensemencés, a totalement empêché le développement des cultures. Des températures de 10°, même 15°, peuvent donner le même résultat (p. 522). Du pus du premier jour, conservé vingt-quatre heures dans un tube à vaccin, reste stérile. On peut vraiment s'étonner de voir une Bactérie, jouissant d'une vitalité si peu considérable, occasionner une affection aussi tenace.

Le *Gonocoque* résiste très peu à la chaleur ; il est tué en quelques minutes à 55° ; en général, il résiste peu au-dessus de 40°.

La dessiccation le fait périr très rapidement.

Il est également très sensible aux antiseptiques, même faibles.

Sur des milieux de culture peu propices, la vitalité s'éteint vite. Elle se maintient longtemps, au contraire, sur des milieux favorables, comme il a été dit précédemment.

Virulence. — Les cultures fraîches sont virulentes, mais perdent rapidement leur activité ; la virulence du microbe est encore plus fragile que sa vitalité. Et encore, pour la constater, doit-on employer des cultures en milieux favorables. Cette virulence est due à des produits toxiques sécrétés par le Gonocoque, produisant, chez les animaux d'expériences, des symptômes d'intoxication et d'inflammation.

Produits formés dans les cultures. — Les cultures ne donnent jamais la réaction de l'indol.

L'action fermentative sur les sucres paraît irrégulière. Le glucose est toujours fermenté ; avec le lévulose et le maltose, les résultats sont tantôt positifs, tantôt négatifs. Les autres sucres ne sont pas attaqués.

Ces données servent principalement à la distinction du *Gonocoque* et du *Méningocoque* (Voy. p. 506 et 511).

Toxines. — Éraud et Hugounenq (1) disent avoir obtenu, de leurs cultures, une diastase et une ptomaïne. Ces substances ont la propriété toute spéciale, la première surtout, de provoquer une inflammation du testicule pouvant aller jusqu'à la suppuration. Mais le microbe qu'ils ont cultivé n'était certainement pas le Gonocoque (Voy. p. 539, *M. orchitis*).

Christmas (2) a isolé du milieu de culture qu'il préconise et des Gonocoques eux-mêmes une substance toxique particulière, *toxine gonococcique* ou *gonotoxine*, qui paraît bien être le principe auquel le microbe doit son activité. Elle ne proviendrait pas, par diffusion, des corps morts du Gonocoque, mais de processus biologiques déterminés par les microbes vivants. Il l'obtient des cultures, en précipitant le liquide filtré sur papier par l'alcool fort ; il se produit un précipité albumineux qui englobe la toxine. Elle se précipite aussi par saturation au sulfate d'ammoniaque du liquide qui la contient. C'est encore une substance diastasique qui supporte sans se modifier un chauffage de 60° pendant une heure et commence à s'altérer après un quart d'heure à 75°. Nous verrons plus loin qu'elle a des propriétés pathogènes incontestables. La solution glycérineuse obtenue en évaporant le liquide de culture à 50°, au bain-marie, avec un dixième de glycérine, conserve longtemps ses propriétés à l'abri de la lumière. La toxine brute s'obtient en filtrant le liquide de culture, vers le vingtième jour, sur bougie en terre d'infusoires de préférence, la bougie en porcelaine retenant une notable quantité de matière toxique. Ces résultats ont été confirmés par Wassermann.

INOCULATION EXPÉRIMENTALE

Inoculation de cultures. — Pour l'*homme*, les cultures fraîches pa-

(1) Éraud et Hugounenq, Recherches bactériologiques et cliniques sur la pathogénie de l'orchite blennorragique et de certaines orchites infectieuses (*Ann. de derm. et de syph.*, IV, 1893, p. 362).

(2) Christmas, *loc. cit.*, et : Contribution à l'étude du Gonocoque et de sa toxine (*Ann. de l'Inst. Pasteur,* XIV, 1900, p. 331).

raissent nettement être virulentes, mais perdent rapidement leur puissance infectieuse. Bokai (1) dit avoir déterminé une véritable blennorragie sur six sujets ayant l'urètre sain. Bockart, Bumm, Wertheim, Kiefer, et surtout Finger, ont également réussi.

Les divers animaux d'expérience se montrent réfractaires. L'introduction de pus blennorragique ou de culture fraîche dans l'urètre ou le sac conjonctival du lapin, du chien, du cobaye, l'injection sous-cutanée, l'injection dans le péritoine ou les articulations, ne donnent rien ; le microbe ne semble pas pouvoir pulluler chez l'animal, peut-être à cause de la température qui est un peu supérieure à 39°, limite de la végétation du Gonocoque dans les cultures. Legrain a obtenu toutefois, chez le cobaye, une légère inflammation de la conjonctive, avec sécrétion peu abondante contenant quelques globules de pus avec Gonocoque. Heller (2) dit avoir observé une pullulation sensible dans le sac conjonctival du lapin nouveau-né ; Finger aurait produit une fois un petit abcès à la suite d'inoculation sous-cutanée de culture pure. Fonseca a produit, chez le lapin, une blennorragie atténuée par inoculation de cultures pures. Les effets obtenus par Nicolaysen (3) sont bien plutôt dus à la toxine qu'à une infection véritable. Ce sont là les seuls résultats obtenus dans un grand nombre d'expériences ; ils ne peuvent guère permettre d'être bien affirmatif.

Pinto (4) signale une très forte exaltation de la virulence, chez le *Gonocoque*, par suite du passage chez le lapin, en injection intra-péritonéale ; la virulence atteindrait le millième de millimètre cube de bouillon de culture. Vannod dit ne pas avoir pu l'observer ; mais le fait a été confirmé par Brückner et Christéanu.

Inoculation de toxine. — La gonotoxine possède une action phlogogène très marquée. Le précipité alcoolique des cultures délayé dans un peu d'eau, ou la solution glycérineuse de Christmas, introduite à la dose de quelques gouttes dans la chambre antérieure de l'œil d'un lapin, déterminent une inflammation violente de la conjonctive avec hypopyon et ulcération de la cornée. Dans le tissu sous-cutané du lapin, à forte dose, une vingtaine de centimètres cubes, elle provoque une tuméfaction assez considérable, très douloureuse, qui donne quelquefois un abcès dû à une infection secondaire facilitée par la diminution de la résistance du tissu. Il survient une réaction générale montrant bien que le lapin subit une intoxication, se manifestant par la fièvre et une perte de poids considérable ; l'animal peut même mourir cachectique. En injection intraveineuse, les mêmes symptômes se produisent, à plus faible dose et plus rapidement. L'injection intracérébrale est plus active ; on peut arriver à tuer un cobaye en cinq à dix heures avec 1/500 ou même 1/1000 de centimètre cube.

Dans la plèvre du lapin, l'émulsion détermine la formation d'un exsudat purulent très abondant ; cet exsudat est toujours stérile.

(1) Bokai, Ueber den Contagium der acuten Blennorrhoæ (*Allgem. med. Centralzeit.* 1880, n° 74).

(2) Heller, Ueber experimentelle Blennorrhoe im Augen neugeborener Kaninchen nebst Erfahrungen über die Cultur des Gonokokkus (*Charité-Annalen*, XXI, 1896).

(3) Nicolaysen, Zur Pathogenität und Giftigkeit des Gonococcus (*Centralbl. für Bakt.*, XXII, 1897, p. 305).

(4) Pinto, Le Gonocoque (*Journ. de physiol.*, 1904, p. 1058).

Sur les muqueuses de l'urètre et du sac conjonctival du lapin et du cobaye, la gonotoxine paraît ne produire aucun effet.

Au contraire, chez un homme n'ayant eu aucune blennorragie, une injection intra-urétrale de 1 centimètre cube de cette émulsion a produit un écoulement purulent accompagné de douleurs à la miction, une véritable blennorragie dont le pus ne renfermait aucun Gonocoque. Christmas a obtenu les mêmes résultats à cinq reprises différentes à des intervalles d'un mois.

Les mêmes effets toxiques sont obtenus, et à un plus haut degré, chez les animaux, par les Gonocoques tués par la chaleur, ce qui démontre que la toxine est surtout contenue dans le corps des microbes; elle ne diffuse que lentement dans le milieu de culture. Toutefois, les corps microbiens des cultures mortes ne laissent diffuser aucun principe toxique.

Beaucoup de ces résultats ont été confirmés par Wassermann et Schottz (1).

Moltschanoff (2) signale, chez l'animal, des altérations intéressantes des nerfs périphériques, rappelant celles de la névrite segmentaire périaxile de Gombault.

IMMUNITÉ ET SÉROTHÉRAPIE

Christmas a obtenu la formation d'*antitoxine gonococcique*, chez la chèvre, à la suite d'injections sous-cutanées de fortes doses de toxine. L'antitoxine neutralise *in vitro* la toxine et, injectée dans le cerveau ou dans le sang, préserve le cobaye contre l'injection intracérébrale de toxine.

Par injection intrapéritonéale, on réussit facilement, d'après Wildbolz (3), à immuniser le cobaye, en commençant par de faibles doses. Le sérum devient fortement agglutinant pour le *Gonocoque*. Vannod (4) dit que l'on réussit mieux sur des lapins, en inoculations sous-cutanées ou intraveineuses.

Brückner et Christéanu (5), en injectant au cheval des cultures à doses de plus en plus grandes, ont obtenu un sérum fortement agglutinant, à plus de 1 p. 2000, et montrant des propriétés curatives réelles chez le lapin, à l'égard d'une injection intrapéritonéale de doses mortelles de cultures. L'utilisation de tel sérum pour le traitement des affections gonococciques n'a pas donné jusqu'ici de résultats encourageants.

HABITAT ET ROLE ÉTIOLOGIQUE

Le *Gonocoque* est l'agent de la blennorragie ; il se rencontre surtout dans le pus des affections blennorragiques de l'urètre, de la vessie, du vagin, de l'utérus, du rectum. On le trouve également dans le pus

(1) Schottz, Biologie der Gonokokkus (*Arch. für Derm.*, XLIX, 1899).

(2) Moltschanoff, Ueber das Gonokokkentoxin und seine Wirkung auf das Nervensystem (*Münch., med. Wochenschr.*, 1899, n° 31).

(3) Wildbolz, Bakteriologische Studien über Gonococcus Neisser (*Arch. für Dermat.* LXIV, 1903, p. 225).

(4) Vannod, Contributions à l'étude du Gonocoque (*Centralbl. für Bakt.*, 2te Abth., Orig., XLIV, p. 110).

(5) Brückner et Christéanu, Sur l'agglutination du Gonocoque par un sérum spécifique (*Soc. de Biol.*, 1906, n° 18).

de l'ophtalmie blennorragique et de l'ophtalmie des nouveau-nés.

Il n'est guère de complications de la blennorragie où le *Micrococcus gonorrheæ* n'ait été signalé ; il paraît être la cause ordinaire de l'épididymite chez l'homme (1) ; chez la femme, bien des métrites, salpingites, péritonites, etc., sont sous sa dépendance. Cependant, il est bon de remarquer que les auteurs de ces recherches n'ont donné souvent que des caractères trop peu précis pour que leur diagnose puisse être regardée comme certaine. Dans les observations un peu anciennes, ils passent en général sous silence les véritables caractères distinctifs du *Gonocoque*, situation dans le protoplasma des leucocytes, décoloration par la méthode de Gram. Il est encore aujourd'hui probable que bien des complications de la blennorragie sont sous la dépendance directe des microbes vulgaires de la suppuration. Il faut cependant faire une exception pour les petits abcès péri-urétraux (2), ayant leur point de départ dans les glandules urétrales ; ce qui confirme l'importance attribuée il y a longtemps déjà par Guiard (3) à l'inflammation de ces culs-de-sac dans la prolongation ou les répétitions de la blennorragie.

On ne peut pas distinguer du *Gonocoque* le diplocoque que l'on rencontre le plus habituellement dans le pus des vulvites ou des vulvo-vaginites des petites filles, dont Vibert et Bordas (4) veulent faire une espèce particulière. Pour ma part, dans de nombreux examens que j'ai pu faire, j'ai le plus souvent décidé en faveur du *Gonocoque*, ainsi que beaucoup d'auteurs sérieux (5). Il me semble qu'il doit y avoir au moins grande probabilité quand on rencontre de nombreux globules de pus bondés de diplocoques tout comme le pus blennorragique le plus caractéristique, diplocoques ayant tous les caractères du Gonocoque, se décolorant par la méthode de Gram, se recolorant fortement en brun par la vésuvine, comme le dit Steinschneider. Il faut aussi bien reconnaître que le coït ou la contagion directe n'est pas le seul mode possible d'infection gonococcique ; qu'il est possible d'incriminer un mode de transport plus indirect, tel que la souillure par des doigts, par des linges, par des poussières ou d'autres objets infectés, comme on l'observe pour bien d'autres affections microbiennes. D'un autre côté, il est aussi possible que l'on puisse, dans un tel cas, avoir affaire à l'un des autres microbes sans action bien marquée, comme ceux qui seront signalés plus loin comme pouvant accompagner le *Gonocoque*. Il en est, en effet, qui, comme lui, se décolorent par la méthode de Gram, et l'on sait que la propriété d'être inclus dans les globules de pus n'est pas spéciale au *Gonocoque*, que beaucoup de Bactéries pyogènes, entre autres les Microcoques de la suppuration, peuvent présenter la même particularité. Cependant les globules de pus sont d'habitude bien moins envahis que

(1) Magaigne et Vanverts, Étiologie et pathogénie des orchi-épididymites aiguës et en particulier des orchi-épididymites d'origine urétrale et non blennorragiques (*Ann. des mal. des org. génito-urin.*, 1896, nº 8).

(2) Celos Pellizari, Le Gonocoque dans les abcès péri-urétraux (*Giorn. ital. d. malat. venerei*, 1890).

(3) Guiard, Des urétrites latentes (*Ann. des mal. des org. génito-urin.*, février 1884).

(4) Vibert et Bordas, Étude sur le Gonocoque (*Méd. mod.*, 15 novembre 1890 et 1er janvier 1891).

(5) Veillon et Hallé, Étude bactériologique des vulvo-vaginites chez les petites filles et du conduit vulvo-vaginal à l'état sain (*Arch. de méd. expér.*, 1896, p. 281). — Laborde, Thèse de Paris, 1896.

lorsqu'il s'agit du *Gonocoque*. Il résulte cependant de tout ceci que, dans les cas d'examens médico-légaux, que visaient surtout Vibert et Bordas, il ne faut jamais se départir de la plus extrême prudence et, si l'on conclut en faveur du *onocoque*, bien faire ressortir que l'infection peut ne pas provenir forcément du contact intime avec un blennorragique, mais aussi être la conséquence d'une infection par transport banal et indirect du contage.

Le Gonocoque peut pénétrer dans la circulatiou générale et déterminer une véritable infection générale, la *gonococcie* (1), grave et parfois mortelle. Il est possible, à l'aide des cultures, de retrouver le microbe dans le sang. Des localisations diverses peuvent se produire. Le rhumatisme blennorragique est connu depuis longtemps : Hallier avait déjà signalé la présence de *Micrococcus* dans le sang d'individus atteints de cette affection ; mais il faut mettre en doute ces constatations au seul examen microscopique, les microbes étant très rares dans le sang. Les arthrites gonococciques sont communes ; le pus contient d'ordinaire en abondance le microbe, que Petrone (2) et Kammerer (3) y ont les premiers signalé. L'endocardite gonococcique est plus rare et plus grave ; on trouve des Gonocoques dans les lésions cardiaques (4). Des phlegmons péri-articulaires ou péri-utérins peuvent être aussi dus au Gonocoque. Des panaris peuvent être d'origine gonococcique. On peut observer des abcès métastatiques contenant du *Gonocoque* à l'état pur. De Jong (5) cite un cas de méningite due au *Gonocoque*. La plupart du temps, la porte d'entrée est une affection blennorragique ordinaire ; d'autres fois, on ne trouve rien comme indication.

D'autres localisations intéressantes ont été signalées. Les ophtalmies gonococciques sont fréquentes ; l'ophtalmie des nouveau-nés, si grave, est d'ordinaire due au *Gonocoque* qui se trouvait présent chez la mère. Fraenkel (6) cite le *Gonocoque* comme pouvant occasionner sur la conjonctive des fausses membranes d'aspect diphtérique. Jesionek (7) l'a trouvé dans une stomatite, d'origine blennorragique il est vrai. On a signalé des bronchopneumonies, des pleurésies, des gangrènes pulmonaires, dues au *Gonocoque*, survenant chez des blennorragiques.

On n'a pas encore rencontré le *Gonocoque* en dehors de la blennorragie. Peut-il être un commensal ordinaire des organes génitaux de l'homme et de la femme ? C'est possible, mais rien n'est encore prouvé de ce côté ; les assertions de Straus, Pescione et Eraud ne sont pas du tout convaincantes. Cela pourrait expliquer les quelques faits cités de

(1) Ghon et Schlagenhaufer, Un cas de gonococcie mortelle (*Wiener klin. Wochenschr.*, 1898, n° 24). — Hallé, Infection gonococcique généralisée (*Ann. de gyn.*, septembre 1898, p. 179). — Colombini, Bakteriologische und experimentelle Untersuchungen über einen merkwürdigen Fall von allgemeiner gonorrhoischer Infektion (*Centralbl. für Bakt.*, XXIV, 1898, p. 955).

(2) Petrone, Sulla natura dell'artrite blennorrhagice (*Rivista clinica*, 1883).

(3) Kammerer, Ueber gonorrheischen Gelenkentzündung (*Centralbl. für Chir.*, 1884, n° 4).

(4) Lartigau, A study of a case of gonorrhœal ulcerative endocarditis, with cultivation of the Gonococcus (*Amer. Journ. of the med. sc.*, janvier 1901).

(5) De Yong, Ein Fall von Meningitis gonorrhoica (*Centralbl. für Bakt.*, 1 Abth., Orig., XLV, 1907, p. 501).

(6) Fraenkel, Der Gonokokkus als Erreger diphterischer Entzündungen der Augenbindehaut (*Hygienische Rundschau*, 1898, n° 7).

(7) Jesionek, *Deutsche Arch. für klin. Med.*, LXI, p. 182.

blennorragie développée sous la seule influence de l'irritation ; mais on sait quelle créance on peut apporter d'ordinaire à de simples affirmations de malades (1).

D'un autre côté, chez l'homme, il est des urétrites dues à d'autres agents microbiens et même des urétrites d'origine amicrobienne (2).

Le *Gonocoque* n'a jamais été rencontré chez les animaux; les urétrites, fréquentes chez certains d'entre eux, sont sous la dépendance d'autres microbes.

RECHERCHE ET DIAGNOSTIC

Il importe donc beaucoup de pouvoir établir un diagnostic différentiel bien assis du Gonocoque et des autres microbes qui peuvent se rencontrer dans les mêmes circonstances.

La forme en diplocoques, et surtout en diplocoques asymétriques, est tout d'abord d'un grand secours en permettant d'éliminer une bonne partie des espèces de forme nettement différente. Les autres en diplocoques, dont l'étude va suivre, ne se décolorent pas par la méthode de Gram, sauf une espèce, encore trop peu connue, signalée dans le mucus vaginal. Toutes ces dernières espèces ne se rencontrent pas dans l'intérieur des globules de pus, ou très rarement, et jamais en très grand nombre comme le Gonocoque.

Pour prendre des matériaux d'examen, lorsqu'il s'agit d'urétrite aiguë, il faut désinfecter le méat et faire sourdre par pression d'arrière en avant une goutte de pus que l'on recueille avec le fil de platine stérilisé.

On opère de même pour une urétrite chronique lorsqu'il existe un écoulement. Lorsque tout écoulement fait défaut, on fait uriner l'individu dans un vase stérilisé et l'on recherche dans l'urine le filament muqueux qui se produit d'ordinaire. Il est bon que le malade n'ait pas uriné depuis plusieurs heures, le filament est plus gros ; il vaut mieux encore prendre l'urine du matin. On recherche le *Gonocoque* dans le filament par la double coloration de Steinschneider. En cas de doute, on peut, par une instillation de nitrate d'argent ou de sublimé, déterminer une légère irritation de la muqueuse ; sous cette influence, le *Gonocoque* se remet un peu à pulluler et devient plus facile à déceler.

Dans le cas d'exsudats, surtout urétraux, vaginaux, oculaires, la mise en cultures, sur plaques de gélose-ascite principalement, peut rendre de grands services.

La recherche dans le sang ne peut se faire qu'au moyen des cultures. Il est à recommander de faire de larges ensemencements à la surface des milieux, le microbe étant d'ordinaire très peu abondant dans le sang.

Pour le diagnostic, on fait donc intervenir :

1° L'*examen microscopique* qui montre la forme, la disposition, la situation intracellulaire, la décoloration par la méthode de Gram.

2° La *mise en cultures* sur milieux spéciaux, permettant de vérifier les caractères des cultures, la manière dont le microbe se comporte à l'égard des sucres, de constater les réactions qui peuvent se produire

(1) Straus, Présence du Gonocoque de Neisser dans un écoulement urétral survenu sans rapports sexuels (*Arch. de méd. expér.*, 1891).

(2) Guiard, Des urétrites non gonococciques (*Ann. des mal. des org. génito-urin.* 1897, p. 449).

au contact du sérum antigonococcique, l'agglutination et la réaction de fixation du complément.

Agglutination. — Les sérums antigonococciques, obtenus comme il a été dit page 530, ont d'ordinaire un pouvoir agglutinant assez élevé, 1 p. 1000, 1 p. 2000 et plus pour l'agglutination microscopique; 1 p. 500 ou 1000 pour l'agglutination macroscopique. L'agglutination se fait d'après les procédés ordinaires; d'après Wildbolz, la réussite serait meilleure en usant de cultures âgées.

On peut suivre exactement les indications données pour le *Méningocoque* (p. 507).

Le sérum antigonococcique agglutine aussi le *Méningocoque* en raison des agglutinines de groupe qu'il contient à côté de l'agglutinine spécifique (Voy. p. 511).

Fixation du complément. — On doit opérer comme il a été dit pour le *Méningocoque* (p. 509). La sensibilisatrice contenue dans le sérum antigonococcique ne fixe le complément qu'en présence d'un antigène gonococcique; si l'émulsion microbienne employée ne renferme pas du *Gonocoque*, ou si le liquide mis en œuvre ne renferme pas de produits solubles d'origine gonococcique, le complément reste libre et agit sur le système hémolytique inactivé où il produit l'hémolyse. L'hémolyse est négative s'il s'agit de *Gonocoque*, positive avec tout autre microbe. Cette réaction apparaît comme sûre, rigoureusement spécifique.

La différenciation avec le *Méningocoque* a été exposée précédemment (p. 510).

Le tableau suivant, emprunté à la thèse de Bosc (1), rendra de réels services au point de vue de la diagnose des espèces qui peuvent surtout prêter à confusion, se rencontrant dans les mêmes conditions, surtout dans les exsudats de l'urètre et du vagin.

I. — Cultures sur gélose jaunes	Liquéfiant la gélatine	Reste coloré par le Gram	*Micrococcus subflavus* de Bumm (p. 535).
		Décoloré par le Gram	*Diplocoque jaune-citrin* de Steinschneider (p. 535).
	Ne liquéfiant pas la gélatine		*Diplocoque jaune non liquéfiant* de E. Legrain (p. 536). *Micrococcus citreus conglomeratus* de Bumm (p. 536).
II. — Cultures sur gélose à centre jaunâtre, à bords blancs ou grisâtres. — Liquéfiant la gélatine			*Diplocoque blanc jaunâtre* de Legrain (p. 536). *Microcoque orangé.* *Micrococcus ochroleucus* de Prove (p. 536).
III. — Cultures sur gélose blanches ou grisâtres	Ne liquéfiant pas la gélatine	Restent colorés par le Gram	*Micrococcus lacteus faviformis* de Bumm (p. 537). *Diplocoque blanc grisâtre* de Legrain (p. 538).
		Décolorés par le Gram	*Microcoque blanc grisâtre* de Steinschneider (p. 538). *Micrococcus albicans amplus* de Bumm (p. 538).

(1) Bosc, Le Gonocoque. Thèse de Montpellier, 1893-1894.

III. (*Suite.*) — Cultures sur gélose blanches ou grisâtres............	Liquéfiant la gélatine.........	Reste coloré par le Gram......	*Diplocoque à colonies foliacées* de Legrain (p. 539).
		Décolorés par le Gram........	*Diplocoque de la vulvo-vaginite* de Vibert et Bordas (p. 531).
			Orchiocoque d'Éraud et Hugounenq (p. 539).
			Gonocoque de Neisser.

On trouvera ci-après la description des principales espèces qu'on peut avoir intérêt à bien savoir distinguer du *Gonocoque*. Il faut cependant se souvenir, pour appliquer ces données, que la liquéfaction de la gélatine par le *Gonocoque* peut être lente et imparfaite.

MICROCOCCUS SUBFLAVUS Bumm.

(*Diplococcus jaune blanc.*)

Il est fréquent dans le mucus vaginal et les lochies. Ce sont des diplocoques de 2 μ à 2,3 μ de plus grand diamètre, assez mobiles, très semblables d'aspect au *Micrococcus gonorrheæ*; ils *restent colorés* après traitement par la solution de Gram, et se distinguent facilement, en outre, par les cultures. On doit lui rapporter le *Diplocoque jaune orangé* de Steinschneider.

On en obtient souvent des cultures pures en ensemençant directement de la gélose avec du pus blennorragique.

Le *bouillon* se trouble au bout de seize heures; il se forme un dépôt jaunâtre au fond du tube.

Sur *plaques de gélatine*, vers la fin du quatrième jour il forme de petites colonies circulaires, jaunâtres, granuleuses. La gélatine se ramollit, puis se fluidifie autour d'elles.

Sur *gélatine en piqûre*, il donne en deux jours des points blanchâtres qui deviennent gris, puis jaunâtres, et enfin jaune d'ocre. La culture ne pénètre pas dans la piqûre ou la strie ; après quelque temps, elle est entourée d'une zone de liquéfaction. Sur *gélose*, la culture, d'abord grise et transparente, devient jaune opaque, puis de couleur jaune ocreux, et enfin se décolore en vieillissant. Sur *pomme de terre*, il ne se forme qu'une mince bande grisâtre, peu appréciable. Le *sérum coagulé* serait liquéfié.

Bumm l'a inoculé sans résultat dans l'urètre et le vagin. Par inoculation sous-cutanée au lapin, il a obtenu un gros abcès, renfermant des diplocoques en quantité. Ce même observateur l'a retrouvé depuis dans l'urine d'une accouchée souffrant d'un catarrhe vésical, dans le contenu des vésicules de pemphigus d'un nouveau-né et dans le pus d'un abcès du sein. C'est peut-être une espèce pathogène ; les cultures, toutefois, ne paraissent avoir aucune action pyogène ; Legrain n'a rien obtenu chez le cobaye, en inoculation sous-cutanée.

MICROCOCCUS JAUNE-CITRIN Steinschneider.

Les éléments sont en diplocoques.

Comme le Gonocoque, il *se décolore* par la méthode de Gram. Il s'en

distingue toutefois facilement par les cultures. Celles sur *gélose* sont assez épaisses et d'un beau jaune-citron. La *gélatine* serait liquéfiée; le dépôt présenterait la même nuance jaune.

MICROCOCCUS JAUNE NON LIQUÉFIANT DE L'URÈTRE LEGRAIN.

Rare dans le pus blennorragique.

Ce sont des diplocoques à éléments asymétriques, de 1,5 μ à 2 μ de long sur 1 μ à 1,2 μ de large; la dessiccation les rétracte beaucoup.

Sur *gélatine*, en *piqûre*, on obtient une culture en clou d'un jaune orangé foncé.

Sur *gélose*, il se forme une large bande d'un beau jaune de chrome.

Sur *pomme de terre*, c'est une culture mamelonnée de même nuance.

C'est un microbe qui paraît être tout à fait inoffensif.

MICROCOCCUS CITREUS CONGLOMERATUS BUMM.

Bumm l'a isolé du pus blennorragique et peut-être de poussières de l'air. Legrain l'a rencontré dans l'urètre d'un chien. Les éléments, qui mesurent à peu près 1 μ, sont réunis en diplocoques souvent accolés par deux. Ils sont très semblables comme forme aux Gonocoques et *restent colorés* par la méthode de Gram.

Sur *gélatine*, il forme de longues colonies d'un jaune-citron, à surface d'abord humide et brillante, puis fendillée et écailleuse, ne liquéfiant pas la gelée. Sur *gélose*, il donne une luxuriante culture jaune-citron, non visqueuse.

Sur *pomme de terre*, la culture est épaisse et de même nuance.

Il semble n'avoir aucune action pathogène.

MICROCOCCUS BLANC JAUNATRE DE L'URÈTRE LEGRAIN.

Diplocoques à éléments asymétriques, mesurant dans leur grand axe de 1,4 μ à 1,8 μ.

Sur *gélatine*, en *strie*, on voit, après quarante-huit heures, une bande mince, d'un blanc crémeux. Après douze jours, la bande est plus épaisse et s'enfonce un peu dans la gélatine. C'est le seul indice d'un commencement de liquéfaction qui ne se prononce pas plus et se perd du reste dès la deuxième culture.

Sur *gélose*, il se forme une bande blanc grisâtre assez large, qui devient jaunâtre au centre.

Sur *pomme de terre*, au bout de huit à dix jours, on observe une bande assez large, jaune pâle.

Cette espèce ne possède aucune action pathogène.

MICROCOCCUS OCHROLEUCUS PROVE.

Cette espèce a été isolée de l'urine par Prove (1), qui l'a décrite avec

(1) PROVE, Micrococcus ochroleucus, eine neue chromogene Spaltpitzform (*Beitr. zur Biol. der Pflanzen*, IV, 3ᵉ p., p. 409, 1887).

quelques détails. Legrain (1) l'a rencontrée dans du pus d'urétrite et dans le pus d'un bubon chancrelleux ouvert aseptiquement.

Les cellules sphériques, mesurant de 0,5 μ à 0,8 μ, sont isolées, réunies par deux en diplocoques, ou plus fréquemment disposées en chapelets de 4, 8, 12 éléments; certains gros éléments atteignent 1,5 μ à 2,8 μ. Les coccus isolés, les diplocoques et les chaînettes sont animés d'un mouvement assez vif.

En culture sur *plaques de gélatine*, les colonies apparaissent dès la dix-huitième heure, sous forme de très petits points; après quatre ou cinq jours, elles sont nettement circulaires, granuleuses, d'un gris jaunâtre, prenant dans la suite une teinte verdâtre. Puis la gélatine se ramollit lentement et se liquéfie après deux ou trois semaines. Les colonies surnagent le liquide clair.

En *piqûre sur gélatine*, la culture s'étale et donne une mince membrane dont le centre se colore en jaune-soufre, tandis que les bords restent blanchâtres. Après un temps assez long, la gélatine se ramollit, devient visqueuse, prend une réaction fortement alcaline et se colore en jaune clair. Les vieilles cultures exhalent une odeur sulfureuse pénétrante. Les cultures sur *gélose* sont d'un blanc sale, crémeuses, avec une strie centrale jaune.

Sur *pomme de terre*, on obtient une culture mamelonnée, tachée de jaune.

Le *lait* montre au bout de cinq à six jours une coloration jaune de toute la surface, plus marquée aux points où s'amasse la crème. Il ne s'y produit pas de coagulation.

La matière colorante est insoluble dans l'eau et soluble dans l'alcool; la solution alcoolique est jaune avec une très légère teinte verte. A l'examen spectroscopique, on observe un léger trouble depuis la ligne D et un assombrissement plus fort sur la ligne F. Les alcalis sont sans action sur la solution colorée; la couleur ne reparaît ni par une neutralisation ni par un excès d'alcali.

D'après Prove, il se formerait de véritables spores dans les cultures maintenues à 36°, au bout de cinq à six jours. Les coccus se gonflent jusqu'à atteindre un volume double; il se forme dans l'intérieur un corps réfringent de 1,6 μ à 1,78 μ de long, possédant les caractères des spores. Ces cultures, entre autres caractères, fertilisent encore un nouveau milieu après avoir été soumises, pendant une demi-heure, à une température de 100°.

MICROCOCCUS LACTEUS FAVIFORMIS Bumm.

Bumm (2) donne cette espèce comme fréquente dans le mucus vaginal normal; il l'a retrouvée, plus tard, dans le mucus utérin et dans les crachats. Legrain l'a souvent isolée des sécrétions vaginales.

Ce sont des diplocoques, souvent isolés ou réunis par deux ou en tétrades, mesurant 1,5 μ, 2,2 μ, quelquefois 2,5 μ de plus grande longueur. Ils *restent colorés* par la méthode de Gram. Ils se cultivent faci-

(1) E. Legrain, Les Microbes des écoulements de l'urètre. Thèse de Nancy, 1888.
(2) Bumm, Beiträge zur Kenntniss der Gonorrhoæ der weiblichen Genitalien (*Arch. für Gynæk.*, XXII, 1884, p. 327).

lement sur tous les milieux, à la température ordinaire, mais mieux vers 37°.

Sur *plaques de gélatine*, les colonies sont petites, grisâtres, très régulièrement circulaires; l'intérieur forme un fin réseau limitant des alvéoles tous égaux entre eux. La gélatine n'est pas liquéfiée.

Sur *gélatine* en *strie*, on voit se former, après un ou deux jours, de petits points blancs qui se réunissent plus tard en plaques d'un blanc de lait. En *piqûre*, on observe de petites colonies globuleuses d'un blanc grisâtre tout le long du trajet. Les cultures réussissent également sur gélatine alcaline ou neutre.

Le *bouillon* peut déjà être troublé après quatre heures.

Sur *gélose*, il se forme une bande d'un blanc grisâtre.

Sur *pomme de terre*, la culture ressemble à celle sur gélose.

Les caractères des éléments des cultures sont les mêmes que ceux de l'organisme. Tous se colorent fortement à l'aide des couleurs d'aniline et ne se décolorent pas par la méthode de Gram. A l'état frais, les coccus paraissent sphériques, réfringents, possédant un mouvement tremblotant. En préparation, les diplocoques offrent la forme asymétrique du *Micrococcus gonorrheæ*, avec le côté concave plus marqué ; en outre, les éléments d'un même couple sont plus rapprochés que dans cette dernière espèce. Lorsqu'on prépare, dans une goutte de liquide, une parcelle de culture pour l'examen microscopique, les diplocoques isolés se disposent sur la lamelle, l'un contre l'autre, en une seule couche; l'aspect de la figure obtenue rappelle alors celui d'un gâteau de miel avec ses nombreux alvéoles. C'est de cette dernière particularité qu'a été tiré le nom de l'espèce.

Les cultures ne possèdent aucune propriété infectieuse. L'espèce ne semble avoir aucun rapport avec la qualité ou quantité de la sécrétion où on la rencontre.

MICROCOCCUS BLANC GRISATRE DE L'URÈTRE Legrain.

Les éléments sont le plus souvent ronds, rarement ovoïdes. Ils mesurent en moyenne 0,8 μ ; certains peuvent atteindre presque 2 μ. Ils *restent colorés* par la méthode de Gram.

Sur *gélatine*, en *piqûre*, la colonie est très lente à venir ; elle reste très minime, formée de petites granulations d'un blanc grisâtre, même après un mois.

Sur *gélose*, on obtient une bande grisâtre, peu épaisse, non visqueuse.

Sur *pomme de terre*, bande grise, uniforme après une quinzaine de jours.

Cette espèce ne possède aucune action pathogène.

MICROCOCCUS BLANC GRISATRE Steinschneider.

Il ne se distingue du précédent qu'en ce qu'il se *décolore* par la méthode de Gram.

MICROCOCCUS ALBICANS AMPLUS Bumm.

Bumm l'a isolé du mucus vaginal où il le donne comme rare (c'est la deuxième espèce du mémoire précité). Legrain l'a rencontré dans un

cas d'urétrite simple. Ce sont des diplocoques isolés, ou quelquefois réunis par trois ou quatre, mobiles. Leur forme est celle du Gonocoque, mais ils sont manifestement plus gros; un couple mesure de 3 μ à 3,5 μ d'un pôle à l'autre ; les dimensions sont moindres dans les cultures jeunes. Ils *restent colorés* par la méthode de Gram.

Cette espèce croît facilement sur *gélatine*, acide ou neutre, à la température ordinaire : il forme, sur le milieu, une bande grisâtre un peu visqueuse. Il ne doit pas se produire de liquéfaction.

Sur *gélose*, la culture est rapide vers 35° ; en quarante-huit heures, il s'y forme une bande grisâtre, molle, qui s'étend assez en surface ; la culture devient visqueuse en vieillissant.

C'est une espèce tout à fait inoffensive.

Sur *pomme de terre*, on obtient en quelques jours une large bande blanche.

Dans le *bouillon*, il se produit un dépôt blanchâtre assez épais ; le liquide est long à s'éclaircir.

MICROCOCCUS BLANC A COLONIES FOLIACÉES Legrain.

Rare dans le pus urétral.

Ce sont des diplocoques formant des amas de 10 à 15 ou de courtes chaînettes de 6 à 10 éléments. Les éléments sont sphériques et mesurent de 0,5 μ à 0,9 μ de diamètre. Ils *restent colorés* par la méthode de Gram.

Sur *plaques de gélatine*, les premières cultures sont caractéristiques. Ce sont des colonies circulaires qui s'entourent bientôt d'une collerette frangée. La colonie peut atteindre plusieurs centimètres de diamètre en huit à dix jours. La gélatine se liquéfie.

Sur *gélatine*, en *piqûre*, il se forme d'abord une petite culture blanche en clou ; puis la gélatine se creuse assez profondément sans qu'il y ait liquéfaction véritable.

Sur *gélose*, en quatre ou cinq jours, on obtient une bande blanche, assez épaisse.

Sur *pomme de terre*, bande blanc grisâtre.

Cette espèce n'a manifesté aucune action pathogène.

MICROCOCCUS ORCHITIS.

(*Orchiocoque d'Éraud et Hugounenq.*)

Éraud et Hugounenq (1) ont décrit sous le nom d'*Orchiocoque* un diplocoque voisin comme forme, comme aspect, comme propriétés, du *Gonocoque de Neisser*, qu'ils ont d'abord isolé de la sérosité vaginale de blennorragiens atteints d'épididymite, et qu'ils ont ensuite retrouvé dans l'urètre ou dans l'urine d'individus vierges de toute blennorragie.

Les dimensions sont un peu plus fortes que celles du Gonocoque ; les éléments de cet *Orchiocoque* atteindraient 1 μ dans leur grand diamètre ; comme le premier, il se *décolore* par la méthode de Gram.

(1) Éraud et Hugounenq, Recherches bactériologiques et cliniques sur la pathogénie de l'orchite blennorragique et de certaines orchites infectieuses (*Ann. de derm. et de syph.*, IV, 1893, p. 362).

Ce sont surtout les cultures qui différencieraient ces deux microbes. L'*Orchiocoque* pousse sur tous les milieux, même sur gélatine, avec abondance, alors que le *Gonocoque* ne donne qu'assez difficilement des cultures et surtout sur des milieux spéciaux.

En injection sous-cutanée, chez le cobaye et chez le chien, les cultures ne produisent pas de suppuration ; injectées dans le testicule, chez le chien, elles déterminent de l'orchite.

Les mêmes auteurs ont retrouvé un diplocoque bien voisin, sinon identique, dans l'orchite des oreillons.

D'après eux, l'orchite ou l'épididymite blennorragiques ne seraient pas sous la dépendance directe de la blennorragie, mais bien produites par un saprophyte à qui l'infection gonococcique crée un milieu favorable et permet de devenir envahissant. Il en serait de même pour l'orchite ourlienne.

MICROCOCCUS ALBICANS TARDISSIMUS Bumm.

Ce sont des diplocoques très semblables à ceux du *Micrococcus gonorrheæ*, que Bumm a rencontrés dans le pus d'écoulements urétraux. Ils *ne se décolorent pas* par la méthode de Gram.

Cette espèce croît très lentement sur la gélatine, *sans la liquéfier* ; en strie, on n'obtient, après plusieurs semaines, qu'une mince bande de 1 millimètre. Sur *sérum*, à 37°, il se forme des points blanchâtres en deux ou trois jours ; ils grandissent lentement et donnent de minces taches humides, grises, à contours sinueux.

Les inoculations n'ont donné aucun résultat.

MICROCOCCUS GIGANTEUS URETHRÆ Lustgarten et Mannaberg (1).

(*Streptococcus giganteus urethræ*, *Streptocoque urinaire*.)

Ce sont des coccus ronds de 1 μ de diamètre environ, unis en chaînes souvent très longues, ondulées ou pelotonnées.

Ils ne poussent pas sur *gélatine*.

Sur *gélose*, ils donnent une mince culture transparente, qui augmente lentement. Dans le liquide de condensation, il y a un trouble floconneux.

Dans le *bouillon*, on voit en vingt-quatre heures un dépôt floconneux. Y aurait-il des rapports avec les Streptocoques de l'urine, décrits par Rovsing (2) dans les cystites ?

MICROCOCCUS MELITENSIS Bruce.

(*Microcoque de la fièvre de Malte.*)

Il a été découvert par Bruce (3) à Malte, dans les organes, rate surtout

(1) Lustgarten et Mannaberg, Ueber die Mikroorganismen der normalen männlichen Urethra und des normalen Harms (*Vierteljahrsschr. für Dermat. und Syphil.*, 1887, n° 4).

(2) Rowsing, Die Blasenentzündung, 1890.

(3) Bruce, Note on the discovery of a micro-organism in Malta fever (*The Practitioner*, sept. 1887). — Id., Sur une nouvelle forme de fièvre rencontrée sur les bords de la Méditerranée (*Ann. de l'Inst. Pasteur*, VII, 1893, p. 289).

et aussi foie et reins, de malades atteints d'une forme de fièvre endémique, épidémique ou sporadique, fréquente à Malte et en bien des points des rivages et des îles de la Méditerranée, nommée pour cette raison *fièvre de Malte* ou *fièvre méditerranéenne*. Toutefois, cette infection est beaucoup plus généralisée que ne semblerait le faire croire cette dénomination; on l'a rencontrée dans toutes les parties du monde.

La maladie est connue depuis longtemps ; avant d'en faire une infection spéciale, on l'avait rattachée à la suette, au paludisme ou à la fièvre typhoïde. C'est la découverte de son microbe qui a permis d'affirmer son entité (1).

MORPHOLOGIE

Caractères microscopiques. — C'est un très petit coccus, de 0,4 μ de diamètre, parfois légèrement ovale de 0,3 μ sur 0,4 ; presque toujours isolé, quelquefois en diplocoques, rarement en courtes chaînes pouvant avoir de 10 à 14 éléments ; toujours immobile, ne montrant pas de cils. Sur les préparations colorées, le diamètre ne dépasse guère 0,3 μ. Dans les vieilles cultures, on trouve souvent des formes plus allongées, bacillaires, souvent irrégulières, en massue.

Coloration. — Il se colore bien aux solutions colorantes ordinaires et se *décolore* par la méthode de Gram.

Cultures. — Il se cultive facilement sur les milieux habituels. Pour l'obtenir de l'homme malade, le mieux est de recourir à l'ensemencement du produit de ponction de la rate (p. 315). C'est un aérobie strict. Sa croissance est assez lente. Il végète très peu à 22° et présente son optimum vers 37° ; il semble se développer encore un peu à 42°.

Sur *gélose*, le long de la strie, après deux à trois jours, se développent des petites colonies souvent isolées, transparentes, semblables à des gouttelettes d'eau ; elles s'accroissent lentement et peuvent atteindre 1mm,5, jusque 3 millimètres, après une huitaine de jours. Elles sont alors arrondies, convexes et même surélevées au centre, à surface lisse, opaques, de coloration blanchâtre ou jaunâtre par transparence. Les colonies peuvent confluer et donner une bande d'aspect muqueux prenant avec l'âge une légère teinte jaunâtre.

Sur *sérum coagulé*, l'aspect est très semblable à celui obtenu sur gélose : c'est un revêtement humide, blanchâtre.

Sur *gélatine*, à 22°, le développement est très lent. En strie, on obtient, en trois ou quatre jours, la même culture que sur gélose, un peu plus sèche. En piqûre, il se forme une petite colonie blanche à la surface, rien dans la piqûre. Il ne se produit pas de liquéfaction.

Sur *pomme de terre*, le développement est très faible, souvent invisible à l'œil ; il est plus fort sur les pommes de terre alcalinisées.

Dans le *bouillon peptonisé*, à 37°, le développement peut être perceptible après deux jours, le plus souvent seulement après trois ou quatre jours. Le liquide se trouble d'une façon uniforme et ne montre pas de

(1) Reports of the Commission of Mediterraneanfever, 1905-1907. — EYRE, The Milroy lectures on melitensis septicæmia (*The Lancet*, 1908, p. 1677, 1747 et 1827). — BRUCE, Maltafever (*Journ. of roy. army med. Corps*, VI, 1906, p. 330). — EYRE, Bibliography of Mediterraneanfever 1837 à 1907.

voile. Après huit jours, il se dépose un sédiment blanchâtre et le liquide s'éclaircit lentement.

Dans le *sérum liquide*, il se forme un sédiment léger, floconneux; le liquide est rarement trouble, reste le plus souvent clair.

Dans le *lait*, le microbe se développe bien, sans changer l'aspect du milieu, sans produire de coagulation. La réaction devient fortement alcaline après quatre à cinq jours; l'emploi de *lait tournesolé* le montre bien. Dans ce milieu, les coccus semblent être régulièrement un peu plus gros.

PROPRIÉTÉS BIOLOGIQUES

Le *Micrococcus melitensis* conserve longtemps sa vitalité. Il résiste longtemps à la dessiccation. On peut le retrouver vivant après des mois, près d'une année, dans des cultures sur gélose desséchées. Dans des cultures cachetées, pour éviter la dessiccation, il est resté vivant plus de deux ans. Il a résisté pendant quatre-vingt-trois jours dans de la terre fumée sèche, stérilisée au préalable ; pendant treize semaines, dans de la terre de jardin humide. Desséché sur du papier buvard, il vivait encore après vingt et un jours; sur de la laine ou des étoffes, jusqu'à quatre-vingt-dix jours. Dans l'eau ordinaire et l'eau de mer stérilisées, il ne périrait qu'après cinq à sept semaines, parfois même dix semaines; dans les mêmes non stérilisées, il résisterait plusieurs semaines, mais pourrait mourir beaucoup plus tôt.

A la chaleur humide, il est tué à 57° en dix minutes ; vers 90°, dans la chaleur sèche.

L'insolation le fait périr dans l'intervalle de quelques minutes à une heure et demie, suivant l'intensité.

L'acide phénique à 1 p. 100, le sublimé à 0,5 p. 1000, le tuent en deux minutes et demie à quinze minutes.

INOCULATION EXPÉRIMENTALE

Il est pathogène pour l'homme et tous les animaux de laboratoire et domestiques.

Obtenu directement du malade, il est trop peu virulent pour déterminer la mort, en inoculation sous-cutanée, intrapéritonéale ou intraveineuse, au *lapin* ou au *cobaye*, quand on n'emploie pas de doses massives; l'inoculation intracérébrale est plus active, et encore, l'animal résiste longtemps, de trois à six mois. Les passages sur lapin ou cobaye augmentent la virulence; il arrive à tuer en trois à douze jours en inoculation intrapéritonéale et en neuf à trente-six heures en inoculation intracranienne. Chez le cobaye mâle, l'inoculation intrapéritonéale détermine souvent une vaginalite purulente et l'atrophie des testicules. En inoculant de très petites doses ou en se servant de cultures peu virulentes, on obtient une forme d'infection chronique, avec amaigrissement et anémie. Chez les animaux qui ont succombé, les ensemencements du foie restent stériles; on obtient quelquefois des cultures avec de la pulpe de rate ou de la moelle osseuse, souvent rien; des reins et de l'urine, on obtient d'ordinaire de belles cultures.

Chez la *chèvre*, on détermine une infection légère par inoculation sous-

cutanée ou intraveineuse. On réussit à avoir des cultures avec l'urine ou le lait. L'infection serait peut-être possible par ingestion. Dans aucun cas, l'animal ne présente de signes d'infection.

Le *mouton*, la *vache*, le *cheval*, le *mulet* peuvent être aussi infectés sans montrer des symptômes nets; le seul signe est l'agglutination du microbe avec leur sang.

Le *singe* donne les résultats les plus intéressants. A la suite d'inoculation sous-cutanée ou intraveineuse, on observe un processus identique à la maladie humaine, une maladie mortelle d'emblée ou guérissable présentant une courbe de température ondulante très semblable à celle que l'on observe chez l'homme. Il se produit une série d'accès fébriles séparés par des rémissions souvent complètes; les accès durent de cinq à dix jours. La maladie peut durer trente ou quarante jours, puis la guérison survient; ou bien la mort peut s'obtenir plus ou moins vite. Les inoculations intracérébrales donnent le plus souvent une affection aiguë, mortelle. A l'autopsie, le microbe peut être isolé de tous les organes et de tous les tissus; la rate est foncée, hypertrophiée : c'est le seul symptôme anormal. Dans les cas légers, on peut ne retrouver le microbe que dans les ganglions lymphatiques et l'urine. Le chien paraît pouvoir être infecté, mais sans apparence de maladie.

L'inoculation à l'*homme*, tentée expérimentalement à plusieurs reprises, reproduit la maladie typique. Les contaminations de laboratoire ont été assez nombreuses et ont même eu des résultats funestes qui commandent une très grande prudence. De simples écorchures paraissent pouvoir servir de porte d'entrée au virus.

IMMUNITÉ ET SÉROTHÉRAPIE

Chez l'homme, une première attaque confère l'immunité, sinon complète, du moins très nette, mais pour peu d'années, une ou deux peut-être.

Chez le lapin et le cobaye, un long traitement par des cultures tuées peut protéger contre l'inoculation de cultures virulentes, ou bien ne donne aucun résultat et même parfois rend l'animal plus sensible. Quelques expériences faites sur l'homme ont donné ce même résultat.

L'inoculation de cultures mortes, et surtout celle de cultures vivantes, détermine la formation dans le sang d'agglutinines qui paraissent spécifiques; le pouvoir agglutinant du sérum peut, avec des cultures vivantes, arriver à 1 p. 1000, 1 p. 1500, même 1 p. 3000. Cette propriété agglutinante existe, du reste, dans le sang des malades, où elle atteint souvent des taux plus élevés; elle sert très avantageusement pour le diagnostic.

Wright, dès 1896, avait tenté d'immuniser des chèvres et un cheval pour obtenir un *sérum* préventif. L'essai sur des malades ne put démontrer la valeur d'un tel sérum. Eyre n'obtint pas de meilleurs résultats.

La Commission anglaise a étudié un *vaccin* obtenu avec des cultures sur gélose âgées de dix jours, émulsionnées dans de l'eau, chauffées à 60° pendant une demi-heure et additionnées d'acide phénique en proportion de 0,5 p. 100. Les résultats n'ont pas été très favorables.

HABITAT ET ROLE ÉTIOLOGIQUE

Le *Micrococcus melitensis* se rencontre chez l'homme atteint de la fièvre méditerranéenne. On l'obtient facilement du produit de ponction de la rate, et encore ordinairement des urines; le sang n'en montre que très peu et par intervalles, pendant les accès surtout. A l'autopsie, le foie, la rate, les reins en fournissent facilement.

Cette maladie est fréquente, son pronostic bénin, avec une mortalité de 2 p. 100 environ. Elle est constituée par une série d'accès fébriles de durée variable, séparés par des périodes de rémission complète. La période d'incubation paraît varier de trois à dix-sept jours, et être en moyenne de huit à dix jours. Les prodromes ressemblent souvent à ceux de la fièvre typhoïde. La fièvre affecte le type ondulant (fièvre ondulante), acyclique. Le premier accès peut durer une vingtaine de jours, les autres une dizaine; la rémission est de trois à quatre jours, parfois quinze. On observe de deux à sept rechutes. Il se produit souvent des symptômes douloureux du type rhumatismal ou névralgique, parfois des fluxions d'articulations, chez l'homme de l'orchite, chez la femme de l'ovaralgie ou de la mammite. Les femmes paraissent plus sensibles à la maladie que les hommes; les enfants au-dessous de quinze ans la prennent très rarement.

Les autopsies sont rares. La muqueuse intestinale montre des plaques de congestion ; les follicules clos et les plaques de Peyer sont normaux, les ganglions mésentériques tuméfiés. Le foie est congestionné ; la rate rouge foncé, presque noire, très friable et très hypertrophiée; les reins congestionnés.

Le microbe est rejeté hors du corps surtout par les urines, qui, par moments, en renferment de grandes quantités. On l'a aussi rencontré dans le lait des nourrices malades. Il ne se trouve pas dans les déjections, ni dans les crachats.

Il paraît être établi que l'homme est surtout infecté par la chèvre par l'intermédiaire du lait. Des recherches faites à Malte ont permis de rencontrer le *Micrococcus melitensis* chez 10 p. 100 des chèvres et de constater chez 40 p. 100 un sérum fortement agglutinant pour ce microbe. Il y a peut-être à incriminer aussi les Insectes piqueurs qui pourraient inoculer le microbe aux individus sains, comme tendent à le démontrer certains faits et quelques expériences sur des singes. Les chèvres et autres animaux domestiques pourraient être infectés de cette façon. L'infection de l'homme peut être plus directe, comme le prouvent beaucoup de cas de contagion de laboratoire ; on peut faire intervenir l'inhalation ou l'ingestion de poussières chargées de microbes, peut-être des piqûres de poux ou de puces, ou même l'infection par de simples écorchures au contact de produits virulents, d'urine chargée de microbes.

Le microbe vit assez longtemps dans l'eau ; il ne paraît pas toutefois que la maladie puisse être transmise de cette façon.

Le bassin méditerranéen paraît renfermer de nombreux foyers d'endémie. La maladie s'est cependant répandue un peu partout. Il semble qu'elle ait suivi l'exportation des chèvres de race maltaise, très estimées comme laitières et expédiées jusqu'en Amérique. Beaucoup de cas observés en France ont pu se rattacher à la présence de chèvres de provenance espagnole. Il est nécessaire d'y veiller.

Dubois (1) aurait observé la fièvre de Malte chez les poules et les canards, chez le mouton; ces animaux pourraient contaminer l'homme.

RECHERCHE ET DIAGNOSTIC

Chez le malade, la ponction de la rate (p. 315) permet d'isoler le microbe, surtout si l'on agit pendant les accès fébriles. Le produit est inoculé largement sur gélose. Après trois à cinq jours à 37°, on obtient des colonies. Le microbe sera identifié :

1° Par l'examen microscopique ;

2° Par la décoloration à la méthode de Gram;

3° Par l'agglutination avec un sérum spécifique fort, à 1 p. 1000 par exemple ;

4° Par la culture en lait tournesolé devenant fortement alcalin et ne se coagulant pas ;

5° Enfin, par l'essai sur le cobaye en inoculation intracérébrale.

Séro-diagnostic. — Wright avait remarqué, en 1897, que le sang des malades atteints de fièvre de Malte agglutinait le *Micrococcus melitensis*. De nombreuses recherches postérieures l'ont confirmé. Le pouvoir agglutinant apparaît dans le sang dès les premiers jours de la maladie ; il est souvent élevé, atteint même 1 p. 1000 ou pour 1500.

Le sérum d'individus sains ou atteints d'autres affections ne produit jamais d'agglutination nette à 1 p. 10. Nicolle (2) signale une exception pour le typhus exanthématique; les symptômes étant bien différents, une confusion ne peut se faire. Des cas positifs, surtout pour la tuberculose et la fièvre typhoïde, sont dus à la coexistence fréquente de ces infections et de la fièvre de Malte.

On se sert d'une jeune culture sur gélose, vers le quatrième jour, que l'on émulsionne dans du bouillon ou de la solution physiologique, ou bien directement dans 1 centimètre cube de la dilution de sérum au taux voulu. L'agglutination au taux de 1 p. 50 peut être considérée comme absolument positive, à plus forte raison celle à des taux supérieurs. La recherche peut se faire macroscopiquement et microscopiquement en suivant les indications données pages 406 et 409.

Les agglutinines, dans l'infection méditerranéenne, passent très facilement et régulièrement dans le lait. On peut s'en servir pour reconnaître l'infection chez la chèvre, fait qui a une très grande importance pratique, en permettant de diagnostiquer chez cet animal une maladie qui peut ne se manifester par aucun symptôme net et dès lors d'éliminer, au point de vue de la consommation du lait, des animaux qui peuvent nuire. Zammit (3) procède en diluant une goutte de lait dans neuf gouttes d'eau distillée et mélangeant à parties égales d'une émulsion de culture sur gélose, ce qui donne alors une dilution à 1 p. 20, très satisfaisante pour la recherche.

L'urine des infectés possède rarement le pouvoir agglutinant.

On peut rechercher aussi le *Micrococcus melitensis* dans le lait par les

(1) Dubois, La fièvre de Malte chez les poules (*Revue vétér. de Toulouse*, 1er août 1910).

(2) Nicolle, Recherches sur la fièvre méditerranéenne (*Arch. de l'Inst. Pasteur de Tunis*, 1909, IV, p. 158).

(3) Zammit, Rapport de la Commission anglaise, VI, 1906, p. 3.

cultures ; on l'obtient facilement. On le retrouve également dans les produits fabriqués avec le lait d'animaux malades, particulièrement le fromage et les crèmes.

Polacci et Ceraulo (1) ont aussi constaté la réaction d'agglutination avec la salive (*salivo-réaction*) et avec la sérosité de vésicatoires (*vésico-réaction*) chez les individus atteints de l'infection ; ces réactions manquaient totalement chez les individus sains ou atteints d'autres affections.

MICROCOCCUS NEOFORMANS Doyen.

Doyen (2) dénomme ainsi un microbe qu'il a rencontré dans les tissus cancéreux et beaucoup de tumeurs bénignes. Il lui attribue un rôle spécifique.

Pour l'obtenir, il ensemence des morceaux de tumeurs, recueillis aseptiquement, dans du *bouillon de mamelle de vache*, qu'il prépare comme le bouillon peptonisé ordinaire, en remplaçant la viande par de la mamelle de vache hachée. Mis à 37°, le liquide se trouble plus ou moins tôt, tantôt vers la vingtième heure, tantôt seulement après trois ou quatre jours.

Le bouillon renferme des coccus mobiles, de 0,5 à 2 μ de diamètre, isolés ou souvent en diplocoques, parfois en tétrades ou en courtes chaînettes.

Ces coccus se colorent bien aux procédés ordinaires et *restent colorés* par la méthode de Gram.

Les cultures sont faciles à obtenir ; le microbe est aérobie facultatif.

Sur *gélose*, il donne une strie humide, blanchâtre, devenant en quelques jours plus épaisse et visqueuse.

Sur *gélatine*, la culture est blanchâtre et liquéfie vers le quatrième jour à 20°.

L'inoculation de cultures aux rats blancs et aux souris donnerait des lésions néoplasiques variées et pourrait causer la mort.

Les cultures en bouillon glycériné, après filtration sur porcelaine, détermineraient chez les cancéreux une réaction similaire de celle que cause la tuberculine chez les tuberculeux. La réaction de fixation du complément s'obtiendrait avec l'extrait des corps microbiens ou un extrait de tissus cancéreux et du sérum de cancéreux.

Le résultat serait négatif dans le cas de néoplasmes non cancéreux. Le sérum d'un cheval traité par des cultures du *Micrococcus neoformans* pourrait produire la fixation du complément, comme le sérum des cancéreux. Enfin tous ces sérums agglutineraient le microbe.

(1) Polacci et Ceraulo, La salivoreazione nella diagnosa della febre mediterranea (*Gaz. sicil. di med. e chir.*, VII, 1908). — Polacci, La reazione agglutinante e l'emobatterioscopia nella diagnosi della febre mediterranea. Palerme, 1909.

(2) Doyen, Le *Micrococcus neoformans* et les néoplasmes. Paris, 1903. — Le diagnostic du cancer par une réaction spécifique avec le *Micrococcus neoformans* (*Soc. de Biol.*, 1908, n° 16).

MICROCOCCUS HÆMATODES Babès.

Babès (1) l'a isolé des sueurs fétides de l'aisselle, qui laissent sur le linge une tache rougeâtre, variant du rouge-brique pâle au rouge-sang. Le dépôt, pris sur le linge, est formé en grande partie de *Micrococcus* sphériques ou ovoïdes, mesurant en moyenne 1 μ de long sur 0,8 μ de large, restant colorés par la méthode de Gram. Ils sont unis en petites Zooglées par une sorte de gelée transparente, rougeâtre. On les retrouve sur les poils des aisselles, chez les personnes atteintes de cette affection; ils en entourent la base d'une gaine rougeâtre et les rendent durs et fragiles.

Ces Bactéries se cultivent très bien sur des blancs d'œufs cuits, à 37°. Elles y forment des Zooglées d'un rouge-sang. La matière colorante semble identique à celle du *Micrococcus prodigiosus*.

MICROCOCCUS DECALVANS Thin.

Thin (2) a désigné sous ce nom (*Bacterium decalvans*) des coccus sphériques de 1 μ de diamètre, qu'il a observés dans la gaine interne de la racine du cheveu, dans des cas de pelade, et qu'il considère comme la cause de cette affection. Sehlen (3) serait arrivé à les cultiver et aurait pu déterminer chez les rats, à la suite de leur inoculation, une maladie cutanée à symptômes identiques. Dans deux cas de pelade examinés dans ce but, j'ai observé, surtout dans l'intérieur des cellules de la gaine de la racine du cheveu, de très nombreux Microcoques parfaitement sphériques d'un diamètre constant de 0,2 μ à 0,3 μ. Ils existaient en très grande abondance dans la gaine vitreuse qui suit le cheveu malade à l'épilation. Ils diffèrent certainement des *Microsporon* décrits par Malassez (4). Toutefois, Bizzozero (5) et Bordoni (6) considèrent le coccus observé par Sehlen comme une des nombreuses espèces qui se rencontrent à l'état normal sur la peau (7).

Vaillard et Vincent (8) ont isolé de différents cas de *pseudo-pelade en plaques* ou *en aires* un *Micrococcus* qu'ils pensent être l'agent spécifique de cette affection contagieuse. En étudiant au microscope, après coloration par le procédé de Gram, des cheveux prélevés au pourtour de la région alopéciée, on voit d'après eux, à leur périphérie, jamais dans leur épaisseur, des petits coccus isolés, réunis par deux ou disposés en amas. C'est surtout la gaine épithéliale du follicule, qui s'arrache souvent en partie avec le cheveu, qui en montre en grand nombre; ils

(1) Babès, Von rothen Schweiss (*Centralbl. für die med. Wissensch.*, 1882, n° 19).

(2) Thin, Alopecia areata und Bacterium decalvans (*Monatshefte für prakt. Dermat.*, 1885, n° 28).

(3) Sehlen, Zur Aetiologie der Alopecia areata (*Virchow's Arch.*, XCIX, 1885, p. 527).

(4) Malassez, *Arch. de physiol.*, 1874.

(5) Bizzozero, *Virchow's Arch.*, XCVIII, 1884, p. 451.

(6) Bordoni, Ueber die biologischen Eigenschaften der normalen Hautmicrophyten (*Fortschr. der Med.*, 1886, n° 5).

(7) Sabouraud, Des origines de la pelade (*Soc. de derm. et de syph.*, 11 juin 1896).

(8) Vaillard et Vincent, Sur une pseudo-pelade de nature microbienne (*Ann. de l'Inst. Pasteur.*, 1890, p. 446).

peuvent même former une véritable gaine autour de la racine du cheveu malade. Sur une coupe de peau malade, colorée par le même procédé, tous les follicules contiennent des amas parfois considérables de ces petits Microcoques sphériques, d'environ 1 μ de diamètre. On en obtient facilement des cultures, en ensemençant du produit de raclage des couches internes de lambeaux de peau malade excisés, ou du sang de ces parties, soigneusement lavées extérieurement avec du savon, lotionnées ensuite au sublimé et à l'alcool absolu.

En ensemençant des tubes de *gélose*, on voit, déjà au bout de vingt-quatre heures à 37°, apparaître de petites colonies blanches circulaires, saillantes, qui atteignent en quelques jours les dimensions d'une lentille, puis restent stationnaires.

Le *bouillon* se trouble en quelques jours, puis abandonne un dépôt blanchâtre.

Dans la *gélatine*, l'ensemencement produit après deux ou trois jours un entonnoir de liquéfaction qui atteint les parois du tube vers le cinquième jour.

Cette Bactérie se cultive mal sur *pomme de terre*, en donnant une mince couche grisâtre.

Dans tous les milieux de culture, on perçoit une odeur fade.

C'est un anaérobie facultatif ; très peu exigeante en oxygène, l'espèce se cultive dans le vide, quoique moins bien.

En injectant sous la peau de souris blanches des doses d'un quart de centimètre cube de cultures dans le bouillon, les auteurs ont déterminé la mort en quarante-huit heures sans lésions apparentes; le sang, la rate, les autres viscères contenaient des microbes en abondance. Les cobayes et les lapins ne ressentent rien d'injections de 1 centimètre cube de ces mêmes cultures.

En frictionnant avec du produit de culture de la peau rasée de cobayes, de lapins et de chiens, on observe la formation d'une plaque de pseudo-pelade identique à celles de l'homme.

Sabouraud (1) décrit dans la *pelade décalvante* chronique un petit coccus de 1 μ de diamètre, qui *reste coloré* par la méthode de Gram, et que l'on rencontre en amas très denses dans l'utricule peladique. Il n'en a pas obtenu de cultures, et ne peut pas être tout à fait affirmatif sur le rôle joué par ce microbe dans l'affection.

Dans les cas où, chez l'homme, les plaques sont rouges et enflammées, on trouve en association avec ce microbe du *Staphylocoque doré* ou du *Streptocoque pyogène*. On peut obtenir des lésions semblables en mélangeant des cultures de ces espèces.

MICROCOCCUS EPIDERMIDIS ALBUS Welch.

C'est le nom qui, par raison de priorité, paraît devoir être attribué à un Microcoque très commun à la surface et dans les couches superficielles de la peau humaine. On est loin d'être fixé sur le rôle qu'il joue. Il semble se comporter d'ordinaire en saprophyte simple; mais, dans des conditions de troubles fonctionnels de la peau, il pourrait abondamment pulluler et devenir alors un agent pathogène actif.

(1) Sabouraud, Des origines de la pelade (*Soc. de derm. et de syph.*, 11 juin 1896).

Il paraît bien être le *Morocoque* décrit par Unna, qui donne les caractères suivants.

Ce sont des coccus ronds ou le plus souvent ovalaires (1,5 μ sur 2 μ), rarement isolés, le plus souvent en diplocoques, quelquefois en tétrades ou en courtes chaînes, associés fréquemment en petits amas mûriformes serrés, se colorant bien aux méthodes ordinaires et *restant colorés* par la méthode de Gram.

La culture est facile et rapide sur milieux ordinaires.

Sur *gélose*, il donne une strie blanc grisâtre, étroite, souvent entourée de nombreuses petites colonies isolées. Sur gélose glycérinée, la culture est plus abondante, plus opaque, et développe une forte odeur butyrique.

Sur *gélatine*, la culture a le même aspect; il se produit une liquéfaction lente, incomplète.

Sur *pomme de terre*, la culture est blanc grisâtre.

Dans le *bouillon*, il se produit un trouble et un dépôt floconneux.

L'inoculation cutanée à l'homme ou à l'animal produirait des lésions d'épidermite inflammatoire, desquamante.

D'après Unna, ce microbe se trouve dans beaucoup d'affections squameuses superficielles ou finement pustuleuses, dans le pityriasis, l'eczéma, l'intertrigo, les onychoses, sur toutes les peaux grasses et acnéiques.

C'est aussi vraisemblablement le microbe qui a été étudié par Cederkreutz (1) sous le nom de *Coccus polymorphe de la peau*, et aussi le *Staphylococcus cutis communis* (*Coccus butyricus*) de Sabouraud (2), présentant des variations de forme assez larges, mais pouvant être facilement ramené au type original par les cultures. Il ne se rencontrerait pas seulement sur la peau, mais dans tous les excreta humains, sueur, urine, etc.

On doit peut-être considérer comme étant une forme d'involution de ce microbe le *Bacille bouteille* qu'a décrit Malassez en 1876 dans les squames du pityriasis capitis, ainsi dénommé par Unna (*Flaschenbacillus*), très fréquent dans la séborrhée, affectant la forme d'une gourde, avec une sorte d'appendice ressemblant à un bourgeon, ce qui l'a fait souvent considérer comme un Blastomycète ou une Levure; d'autres éléments sont sphériques ou presque bacillaires. Les cultures n'ont jusqu'ici donné aucun résultat sûr.

MICROCOCCUS PSITTACI Wolff.

Cette espèce détermine, chez les perroquets, une affection pyémique mortelle, qui fait périr une grande partie de ces oiseaux importés en Europe, sévissant surtout sur ceux qui viennent des côtes de Guinée. D'après Eberth (3) et Wolff (4), qui l'ont étudiée, la maladie débute par une diminution rapide de l'appétit; les animaux deviennent tristes, lan-

(1) Cederkreutz, Recherches sur un coccus polymorphe, hôte habituel et parasite de la peau humaine. Paris, Steinheil, 1901.

(2) Sabouraud, *In* Pratique dermatologique, 1903, t. I, p. 714.

(3) Eberth, Zur Kenntniss der Mycosen bei Thieren (*Virchow's Arch.*, t. LXXXVIII, 1880, p. 311).

(4) Wolff, Eine verbreitete thierische Mycose (*Virchow's Arch.*, t. XCII, 1883, p. 252).

guissants, laissent traîner leurs ailes. Ils sont pris de diarrhée muqueuse, accompagnée parfois de vomissements de matière jaune verdâtre ; puis surviennent des convulsions qui se terminent par la mort. A l'autopsie, on trouve le foie, la rate et les reins d'un rouge noirâtre, gorgés de sang; le foie surtout présente de nombreuses petites taches grises; la muqueuse de l'intestin est pâle et parsemée de macules grises. Le sang renferme une grande quantité de coccus très petits, isolés, ne se colorant que faiblement par le violet de méthyle. Dans les coupes des organes cités, les capillaires et les veines d'assez gros calibre sont remplis d'amas de Microcoques; les capillaires des villosités intestinales en sont bondés.

Ces *Micrococcus* sont plus petits que ceux des affections pyémiques de l'homme. Eberth leur trouve une ressemblance avec ceux qu'il a rencontrés dans un cas de pharyngite croupale du poulet.

A rapprocher peut-être des courts *Bacilles de la septicémie des canards* qui seront étudiés plus loin. Le Bacille qui est l'agent de l'infection désignée sous le nom de *psittacose* par Gilbert et Fournier (1) est certainement une autre espèce (Voy. *Bacille de la psittacose*).

MICROCOCCUS BOMBYCIS Béchamp.

(*Microzyma bombycis.*)

Béchamp (2) avait signalé, en 1867, la présence de Bactéries dans l'intestin des Vers à soie morts de *flacherie*. C'est une maladie épidémique pouvant exercer des ravages considérables dans les magnaneries et atteignant surtout les Vers forts, prêts à filer leur cocon. Les Vers malades cessent de manger, languissent et meurent en quelques jours. Les cadavres sont très mous, d'où les noms vulgaires de *morts flats* ou *morts blancs*, puis pourrissent rapidement en exhalant une odeur fétide, aigrelette. Pasteur (3), dans ses belles recherches sur cette affection, a montré qu'elle était due au développement, dans le tube digestif, de plusieurs espèces de Bactéries, parmi lesquelles se rencontrent surtout une espèce en bâtonnets très mobiles, dont certains articles présentent des spores, et un *Micrococcus* à éléments très petits, le plus souvent en diplocoques, parfois en courts chapelets. Il est parvenu à retrouver ces mêmes organismes dans des macérations de feuilles dont se nourrissent les Vers. Ces diverses espèces jouent certainement un rôle différent dans l'infection. Le *Micrococcus*, par exemple, peut se développer dans un Ver sans entraîner la mort; les bâtonnets mobiles (vibrions) sont beaucoup plus actifs. Les Vers infectés par le mélange de ces Bactéries avec les aliments meurent dans un temps compris entre six et quinze jours; ceux inoculés par piqûre, avec du contenu intestinal de morts flats, meurent entre deux et trois jours. De plus, la maladie déterminée à l'aide de la macération de feuilles de mûrier ne tue le Ver qu'en douze ou quinze jours; chez ceux inoculés avec de la matière prise dans un Ver mort de l'affection, la mort survient plus vite, de sept à huit jours

(1) Gilbert et Fournier, De la psittacose (*Acad. de méd.*, 20 octobre 1896).
(2) Béchamp, *C. R. de l'Acad. des sc.*, t. LXIV, 1867.
(3) Pasteur, Étude sur la maladie des Vers à soie. Paris, 1879.

d'ordinaire. Ici donc, la matière virulente augmente sa puissance par le passage dans un organisme; c'est un caractère que l'on sait commun à beaucoup d'affections septiques.

Sartinara et Paccanaro (1) regardent comme le principal agent de la flacherie un Micrococque qu'ils dénomment *Streptococcus bombycis*. Ce sont d'assez longues chaînettes de petits coccus de 0,9 μ de diamètre, se colorant bien aux méthodes ordinaires et *restant colorés* par la méthode de Gram. Anaérobie facultatif, il se cultive facilement sur les milieux ordinaires, ne liquéfie pas la gélatine et ne forme pas d'indol dans le bouillon. L'ingestion de culture déterminerait la flacherie chez les Vers à soie.

Les Vers à soie ne sont pas les seules chenilles susceptibles de contracter la flacherie. Plusieurs autres espèces de Lépidoptères y sont sujettes, entre autres la *Noctuelle des moissons*, l'*Agrotis segetum*, si nuisible aux cultures.

L'étiologie de la flacherie a été élucidée par les expériences de Pasteur. La cause principale paraît en être la stagnation des aliments dans l'intestin, due probablement au défaut de fonctionnement de cet organe, d'où pullulation des germes de putréfaction qu'ils contiennent. Cependant, des recherches ultérieures peuvent indiquer qu'il y a lieu aussi de faire entrer en ligne de compte certaines affections bactériennes du mûrier qui introduiraient dans le tube digestif du Ver des microbes dangereux pour lui (2).

MICROCOCCUS DE LA MAMMITE CONTAGIEUSE DE LA VACHE Nocard et Mollereau.

(*Micrococcus mastitis.*)

Cette Bactérie cause une variété de mammite chronique, sévissant sur les vaches laitières; elle a été étudiée d'abord cliniquement par Gerlach et Zürn, puis cliniquement et bactériologiquement surtout par Nocard et Mollereau (3). C'est la même affection qui a été observée en Suisse par Hess et Borgeaud (4), puis par Zschokke (5) et décrite par eux sous le nom de *Gelber Gall*; Adametz (6) a démontré cette identité. Il a attribué au Micrococque de Nocard et Mollereau le nom de *Streptococcus agalactiæ contagiosæ*. C'est aussi cette même espèce que Guillebeau et

(1) Sartinara et Paccanaro, Der Streptococcus bombycis in Bezug auf die Aetiologie der Auszehrung und Schlaffsucht der Seidenraupe (*Centralbl. für Bakt.*, 1te Abth., Orig., XL, 1905, p. 207 et 331).

(2) Boyer et Lambert, Sur deux nouvelles maladies du mûrier (*C. R. de l'Acad. des sc.*, 21 août 1894). — Macchiati, Lo Streptococcus bombycis e la flaccidezza del baco da Seta (*Stazioni sperim. ital.*, XXI, 1891). — Peligon, Bacteriosi del gelso (*Centralbl. für Bakt.*, 2te Abth., III, 1897, p. 16 et 60).

(3) Nocard et Mollereau, Sur une mammite contagieuse des vaches laitières (*Ann. de l'Inst. Pasteur*, 1887, n° 3, p. 109). Voy. aussi : Nocard et Leclainche, Les maladies microbiennes des animaux. Paris, Masson, 3e édit., 1903, T. II, p. 317.

(4) Hess et Borgeaud, Euterentzündung contagiöse oder « Gelber Galt » der Kühe (*Schweizer Arch. für Thierheilk.*, XXX, 1888, p. 97).

(5) Zschokke, Beitrag zur Kenntniss des gelben-Galtes (*Landw. Jahrb. der Schweiz*. VII, 1893, p. 200).

(6) Adametz, Beitrag zur Kenntniss des Streptokökken des gelben Galt (*Journ. für Landw.*, XLII, 1894).

Hess (1) ont étudiée sous le nom de *Streptococcus mastitis sporadicæ*. La maladie est contagieuse et se propage rapidement dans les étables. Le premier symptôme en est l'apparition d'une induration dans la mamelle, à la base d'un trayon. Le *nœud* grandit lentement et donne une tumeur grosse comme un œuf de poule ou comme le poing, mal délimitée, se perdant insensiblement dans le tissu voisin. Une grande partie de la glande peut ainsi se prendre, mais peu à peu, après plusieurs mois. La mamelle malade ne sécrète plus autant et le lait obtenu par traite a beaucoup changé; sa réaction est ordinairement acide; il se coagule vite, souvent dès sa sortie du trayon ; il devient jaunâtre, granuleux, et dégage parfois une odeur fétide; si on le mélange à d'autre qui est bon, toute la masse s'altère. Cependant la santé générale ne paraît guère souffrir. L'affection peut coexister avec d'autres maladies contagieuses, en particulier avec le cowpox. Il n'y a là qu'une simple coïncidence, toute fortuite, les Bactéries spécifiques bien distinctes se trouvant à l'exception des autres, comme j'ai pu le constater, dans les lésions caractéristiques des différentes maladies dont un même individu est porteur.

MORPHOLOGIE

A l'examen microscopique, on trouve, dans le lait (fig. 229) et dans la paroi des canaux excréteurs, de nombreux *Micrococcus*, arrondis ou ovoïdes, mesurant à peine 1 μ de diamètre, réunis en chapelets parfois très longs et sinueux. Beaucoup sont ovoïdes, allongés et présentent un étranglement médian, indice de la division qui va s'opérer. Ils se colorent bien par les couleurs d'aniline, mais se décolorent facilement; la méthode de Gram *enlève, en grande partie, leur coloration*; celle de Weigert réussit mieux à décolorer. On observe, en outre, de nombreux globules de pus.

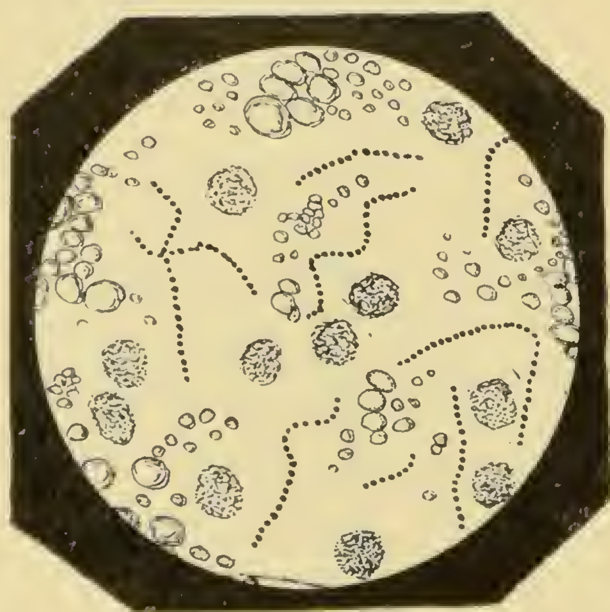


Fig. 229. — Lait de vache affectée de mammite contagieuse.

Cultures. — Les cultures sont faciles à obtenir avec du lait, obtenu privé de germes étrangers par le moyen indiqué par Duclaux (2). On lave le trayon soigneusement avec une solution antiseptique, puis on recueille du lait dans des tubes stérilisés, en évitant de les faire toucher le pis, après avoir laissé perdre le premier jet.

Le *bouillon* légèrement alcalin, surtout additionné d'un peu de sucre ou de glycérine, est un excellent milieu. On y trouve, après vingt-quatre heures à 35°, une quantité de très longues chaînettes; il peut même se former des flocons soyeux dans le liquide. Au bout de quelques jours,

(1) Guillebeau et Hess, Ueber die Symptomatologie und Therapie der Euterentzündungen bei Rindern und Ziegen (*Landw. Jahrb. der Schweiz.*, VIII, 1894, p. 240).

(2) Duclaux, Mémoires sur le lait (*Ann. de l'Inst. agron.*, 1882).

il s'est déposé un sédiment blanchâtre, léger; le bouillon reste limpide, mais se trouble par la moindre agitation. Il est déjà devenu acide après vingt-quatre à quarante-huit heures. L'excès d'acide nuit à la culture; en ajoutant de la craie, la culture est plus vigoureuse et reste vivante plus longtemps. Il se forme alors, dans le bouillon, un magma de cristaux de lactate de chaux; le rôle de ce *Micrococcus* est donc le même que celui du *Bacillus lacticus*, c'est un *ferment lactique* énergique. Les cultures ne sont pas très résistantes; elles restent souvent stériles après quelques semaines de développement. Elles paraissent aussi bien réussir à l'abri de l'air; c'est une Bactérie à la fois aérobie et anaérobie.

En cultures sur *plaques de gélatine*, on aperçoit, du troisième au quatrième jour, de petites colonies rondes, granuleuses, à bords nets, d'abord transparentes, puis jaunâtres et brunes. Le développement en est très lent; celles de la surface ne forment qu'une légère saillie après plusieurs semaines. La gélatine *n'est pas liquéfiée.*

A la suite de l'inoculation en *piqûre* dans un tube de *gélatine*, il se forme, au troisième jour, une mince pellicule à la surface et un léger trouble dans le canal. Plus tard, la culture devient plus épaisse, blanche, opaque, granuleuse, et envoie parfois de fines arborisations dans la gelée.

En *strie* sur *gélatine*, *gélose* et *sérum*, il se produit, le long de la strie, de petites colonies rondes, translucides, blanchâtres, qui confluent quelquefois en une mince pellicule.

Le *lait* est coagulé avant vingt-quatre heures. Il a une forte réaction acide.

Sur *pomme de terre*, la culture est très minime.

INOCULATION EXPÉRIMENTALE

La maladie se reproduit, facilement chez la vache et la chèvre, par l'inoculation de cultures pures dans le trayon. Les injections dans le péritoine et intraveineuses, tentées chez le chien, le chat, le lapin, le cobaye, n'ont donné aucun résultat.

ROLE ÉTIOLOGIQUE

L'affection se communique bien certainement, dans une étable, de vache à vache, par la main des personnes qui font la traite. On peut l'enrayer au début, en faisant, après la traite, des injections antiseptiques, avec une solution d'acide borique à 3 p. 100, dans la glande malade; toutefois, après guérison, la glande ne sécrète plus autant. Lorsque le mal a envahi une forte partie de la mamelle, on peut encore l'arrêter par des injections répétées fréquemment, mais la glande est perdue complètement pour la lactation.

Lucet (1) a décrit, dans du lait de vaches atteintes de mammites infectieuses, plusieurs Bacilles dont le rôle pathogénique n'est pas certain. D'après Freudenreich (2), de telles Bactéries pourraient nuire à la fabrication de fromage avec ces laits.

A rapprocher peut-être de cette espèce des Streptocoques isolés de laits ayant paru occasionner des phénomènes d'entérite infectieuse.

(1) Lucet, *Recueil de méd. vétér.*, 1889, p. 423.
(2) Freudenreich, Sur quelques Bactéries produisant le boursouflement des fromages (*Ann. de micr.*, II, 1890, p. 353).

RECHERCHE ET DIAGNOSTIC

Il est surtout intéressant de différencier cette mammite de la mammite tuberculeuse. L'examen bactériologique et les cultures lèveront facilement les doutes.

MICROCOCCUS DE LA MAMMITE GANGRENEUSE DE LA BREBIS Nocard (1).

On connaît sous les noms vulgaires de *mal de pis*, *araignée*, une vive inflammation de la mamelle, observée surtout chez les brebis exploitées pour l'obtention du lait, qui passe à l'état gangreneux et amène ordinairement la mort de l'animal en vingt-quatre, trente-six ou quarante-huit heures. La mamelle atteinte se gonfle rapidement, devient dure, très œdématiée, d'un rouge violacé, chaude et douloureuse à la pression. La partie malade se limite des tissus sains comme une plaque d'érysipèle. L'engorgement fait des progrès; puis les parties envahies se mortifient. La ponction de l'œdème donne un liquide roussâtre qui fourmille de Micrococques. L'état général devient très grave, les mamelles se gangrènent entièrement et l'animal meurt. La plupart des brebis atteintes succombent ; chez quelques-unes, l'œdème s'arrête, les tissus infiltrés meurent et s'éliminent lentement, la cicatrisation se fait : la brebis guérit, mais la mamelle est perdue.

MORPHOLOGIE

Les Micrococques, que l'on trouve dans la sérosité et le lait (fig. 230) dès le premier jour, sont de petite taille, mesurant à peine 0,2 μ de diamètre ; ils sont isolés, réunis par quatre ou en petits amas, mais jamais en chapelets. Ils *restent colorés* après traitement par la méthode de Gram.

Cultures. — On les cultive très bien dans du *bouillon* additionné d'un peu de sucre. En vingt-quatre heures, le liquide est devenu trouble, lactescent. Au bout de deux jours, il offre un dépôt abondant ; il est devenu acide, moins cependant que lorsqu'il s'agit de l'espèce précédente, et le développement s'arrête. En ajoutant un peu de craie au liquide, on prolonge la végétation. Les cultures se font aussi bien à l'abri de l'air qu'en sa présence, comme pour l'espèce précédente.

Cette Bactérie se multiplie très vite dans le *lait* ; elle y provoque la formation, en vingt-quatre heures, d'un coagulum ferme ; le petit-lait et le coagulum, devenus acides, fourmillent de Micrococques.

En cultures sur *plaques*, on observe dans la gélatine, au troisième jour, des colonies rondes, blanches ; celles qui arrivent à la surface grandissent plus vite et provoquent rapidement la liquéfaction de la gelée. Elles sont formées d'une tache centrale arrondie, brunâtre, entourée d'une auréole de liquéfaction.

En *piqûre*, dans un tube de *gélatine*, le développement se fait rapide-

(1) Nocard, Note sur la mammite gangreneuse des brebis laitières (*Ann. de l'Inst. Pasteur*, 1887, n° 9, p. 417).

ment. La liquéfaction est déjà nette à la surface vers le second jour à la température de 20°. Au cinquième jour, on obtient un large cône de liquéfaction, dont le sommet obtus, tourné en bas, renferme une masse blanche. Dans une atmosphère d'acide carbonique, la liquéfaction est beaucoup plus lente à se montrer; elle n'est bien nette qu'après une dizaine de jours; la Bactérie se développe maigrement dans tout le trajet de la piqûre.

Sur *gélose*, il se forme une pellicule épaisse qui, d'un blanc mat au début, devient peu à peu jaunâtre.

La culture sur *pomme de terre* donne une mince couche grisâtre, à

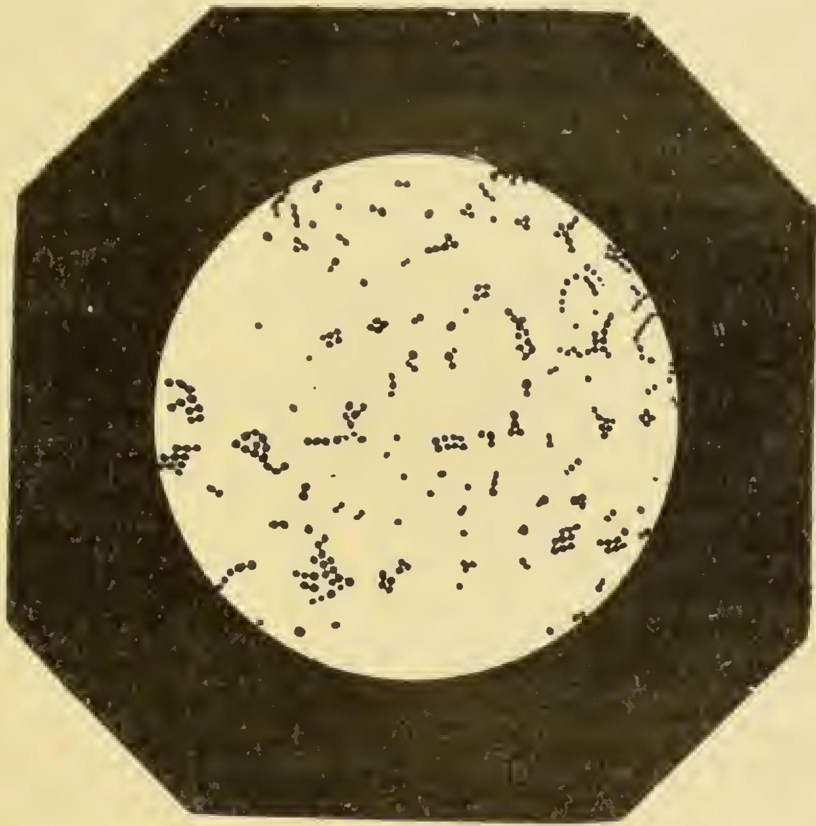


Fig. 230. — Micrococque de la mammite gangreneuse de la brebis (d'après Nocard).

bords festonnés plus épais que le centre. Elle prend peu à peu une teinte jaune; la zone périphérique jeune reste seule grisâtre.

INOCULATION EXPÉRIMENTALE

L'injection de quelques gouttes de culture fraîche dans le trayon d'une brebis détermine une mammite rapidement mortelle. Les cultures ne gardent leur virulence intacte que si l'on a soin de les renouveler chaque jour. La chèvre paraît réfractaire. Des inoculations sous-cutanées, faites à des chiens, chats, cobayes, n'occasionnent qu'un peu d'œdème au point d'introduction. Chez le lapin, au contraire, elles produisent des abcès dont le pus contient en très grand nombre la Bactérie en question.

La brebis semble seule apte à contracter la maladie expérimentale. L'inoculation au lapin détermine la formation d'un abcès chaud dont le pus renferme en grand nombre les Micrococques spéciaux; l'animal ne paraît aucunement en souffrir.

Cette mammite gangreneuse de la brebis ne cède à aucun traitement;

le seul moyen de sauver la femelle est celui employé de tout temps par les bergers : faire une incision cruciale, extirper les lambeaux de la glande malade et panser avec une solution concentrée de sulfate de cuivre. Et encore la mamelle est perdue sans retour. L'étiologie de cette affection n'est pas encore éclaircie ; elle sévit à l'état enzootique dans plusieurs régions et cause beaucoup de dommage dans les troupeaux des fromagers.

Roger et Garnier (1) ont rencontré dans un cas de mammite gangreneuse chez la femme un *Micrococcus* voisin de celui de la brebis, mais s'en distinguant cependant par quelques caractères. Anaérobie facultatif, il reste également coloré par la méthode de Gram. En culture dans le bouillon, il donne un trouble uniforme et un dépôt abondant. La gélatine n'est pas liquéfiée. Sur gélose, il donne de petites colonies blanchâtres. Le lait est assez rapidement liquéfié. L'inoculation au lapin et au cobaye détermine des suppurations cutanées et viscérales qui entraînent le plus souvent la mort.

MICROCOCCUS DE LA FIÈVRE APHTEUSE DES BOVIDÉS.

On est très peu fixé jusqu'ici sur l'agent virulent de cette affection. Le liquide des pustules qui se développent sur les muqueuses, à la bouche principalement (*Maulseuche*), et aux endroits où la peau est mince, entre les onglons (*Klauenseuche*) et à la mamelle surtout, est manifestement virulent et peut-être contient exclusivement l'agent actif : la virulence du sang est des plus douteuse.

La fièvre aphteuse sévit surtout sur les bovidés et le porc, souvent sous forme d'épizootie. Les moutons et les chèvres sont aussi très réceptifs. Le chien et le chat pourraient la contracter à la suite d'usage de lait fourni par des bêtes malades ou d'inoculation de virus très actif. Les lapins, cobayes, souris, rats, oiseaux, sont tout à fait réfractaires à la contagion et aux inoculations expérimentales.

La contagiosité à l'homme ne peut faire aucun doute. L'homme prend la fièvre aphteuse par inoculation directe du virus de bêtes malades ou par ingestion de lait qui en provient et se trouve souillé par des matières virulentes. Le beurre et le fromage frais conservent la virulence et peuvent aussi être infectants pour l'homme.

Le virus aphteux est très actif ; il suffit de doses très minimes, un cinq-millième de centimètre cube par exemple, pour déterminer l'infection.

L'agent de contage n'est pas encore connu, malgré de nombreuses recherches faites dans ce sens.

Piana et Fiorentini (2) ont incriminé un Protozoaire, sorte d'Amibe, qu'ils disent rencontrer toujours dans le contenu des vésicules aphteuses ; ils l'ont nommé *Protamoeba aphtogenes*. Les expériences qu'ils rapportent ne sont nullement concluantes.

(1) Roger et Garnier, Sur un cas de mammite gangreneuse (*Soc. de Biol.*, 15 juillet 1899).

(2) Piana et Fiorentini, Neuer Beitrag zur Morphologie und Biologie des pathogenen Protozoen (Protamoeba aphtogenes) der Maul und Klauenseuche (*Centralbl. für Bakt.*, XXIII, 1898, p. 323).

Prévost (1) donne aussi un Sporozoaire comme agent de l'affection. Ce Sporozoaire, qu'il isolerait du contenu des pustules de la salive des animaux malades, se cultiverait un peu sur rave cuite et bien mieux dans un bouillon composé à réaction acide dont la composition est tenue secrète. Les cultures seraient virulentes et pourraient donner l'immunité aux bovidés.

Kurth (2) et Schottelius (3) ont isolé des vésicules aphteuses un Microcoque en chaînettes que Kurth nomme *Streptococcus involutus*. Il l'a obtenu en cultures.

Dans un mélange à parties égales de sérum de veau ou de bœuf et de bouillon peptonisé, il donne, en vingt-quatre heures, un voile épais, cireux, d'un jaune brillant; le liquide reste clair.

Sur gélose additionnée de son volume de sérum, il forme une culture semblable.

Les éléments de ces cultures possèdent une sorte de capsule qui ne se colore pas aux couleurs d'aniline.

L'inoculation de ces cultures au veau ne donne aucun résultat.

Siegel (4) a décrit dans le contenu des vésicules aphteuses des bovidés et de l'homme une courte Bactérie de 0,5 μ à 0,7 μ, se colorant presque uniquement aux deux pôles et se décolorant par la méthode de Gram. Elle se cultive facilement sur tous les milieux et ne liquéfie pas la gélatine. Son inoculation aux veaux et aux porcelets détermine une sorte de septicémie, avec production de taches rouges à la peau et gonflement de la muqueuse buccale et nasale, en somme quelque chose d'analogue au scorbut. Le même microbe a été retrouvé par Bussenius (5).

Stutzer et Hartleb (6), en cultivant du contenu de vésicules aphteuses sur de la gélose additionnée de petit-lait, à réaction faiblement acide, ont isolé un microbe assez polymorphe, se présentant sous forme de diplocoques, de courtes chaînettes, ou de petits bâtonnets ovoïdes, de 0,5 μ à 1 μ de largeur, qu'ils croient pouvoir jouer un rôle actif dans l'infection, sans cependant avoir observé rien de probant à ce sujet. Ce microbe croît bien sur les divers milieux; suivant le cas, il se présente sous forme de coccus, de diplocoques, de streptocoques, de bâtonnets et même de filaments pouvant donner des ramifications. Il n'est pas possible d'être en quoi que ce soit affirmatif; le microbe paraît cependant être réellement pathogène pour les jeunes veaux.

Lœffler (7) fait table rase de toutes ces données, et pense que l'agent de contage de la fièvre aphteuse reste encore à découvrir. Pour lui, ce doit être un microbe de dimensions très minimes, restant en deçà des

(1) Prévost, Première étude sur la fièvre aphteuse. Besançon, 1900.

(2) Kurth, Bakteriologische Untersuchungen bei Maul und Klauenseuche (*Arb. aus dem kaiserl. Gesundheitsamte*, VIII, 1893, p. 439).

(3) Schottelius, Ueber einen bacteriologischen Befund bei Maul und Klauenseuche (*Centralbl. für Bakt.*, XI, 1892, p. 75).

(4) Siegel, Die Mund-euche (stomatitis epidemica), Maul und Klauenseuche der Menschen (*Arch. für Laryng.*, 1895).

(5) Bussenius et Siegel, Zur Frage des Bacillus der Maul und Klauenseuche (*Deutsche med. Wochenschr.*, 1897, p. 127).

(6) Stutzer et Hartleb, Das Bakterium der Maul und Klauenseuche (*Arch. für Hygiene*, XXX, 1897, p. 372).

(7) Loeffler, Bericht der Kommission zur Erforschung der Maul und Klauenseuche, bei dem Institut für Infektionskrankheiten in Berlin (*Deutsche med. Wochenschr.*, 1898, nº 35, et *Centralbl. für Bakt.*, XXIV, 1898, p. 569).

limites de la visibilité, même avec les objectifs les plus perfectionnés, et pouvant traverser les pores des filtres employés, *microbes invisibles* ou *filtrants* (p. 16). Ce microbe ne peut se développer que dans des organismes réceptifs; aucune culture en milieux artificiels ne lui a donné de résultats. C'est à cette même conclusion, existence d'un microbe trop ténu pour être visible, que Nocard et Roux (1) sont aussi arrivés pour la péripneumonie bovine.

D'après Lœffler et Frosch (2), on pourrait conférer l'immunité aux animaux en leur injectant dans les veines de un centième à un dixième de centimètre cube de lymphe aphteuse chauffée à 37° pendant douze heures. Le sang de ces animaux immunisés contient des substances protectrices ; en le mélangeant avec de la lymphe active et en injectant le mélange, qu'ils désignent sous le nom de *Séraphtine*, à des animaux neufs, non seulement ceux-ci ne prennent pas la maladie, mais ils présentent une immunité réelle à l'égard de doses de virus frais qui sont réellement infectantes. On pourrait peut-être arriver, en procédant suivant cette méthode, à vacciner, au moins temporairement, des animaux encore indemnes en cas d'épidémie. Lœffler et Uhlenhuth (3) ont observé que le sérum d'animaux fortement immunisés donne de bons résultats comme agent de préservation.

Siegel (4) a aussi annoncé que le sang recueilli en pleine éruption vésiculeuse était nettement immunisant en injection sous-cutanée ; cette propriété se conserverait plusieurs semaines dans le sang défibriné et mélangé à de la glycérine.

MICROCOCCUS DE LA PÉRIPNEUMONIE DES BOVIDÉS.

La sérosité albumineuse, jaunâtre, limpide, qui se trouve en très grande abondance dans les parties hépatisées du poumon des bovidés atteints, a un pouvoir virulent considérable. L'inoculation d'une seule goutte sous la peau du tronc d'une vache ou d'un bœuf amène un engorgement considérable, une fièvre intense et souvent la mort.

Le cheval, le porc, le mouton, la chèvre, le chien, le lapin, le cobaye, les volailles, sont tout à fait réfractaires. L'homme également.

De plus, les bovidés qui ont résisté à l'infection sont devenus réfractaires aux inoculations virulentes et à la contagion naturelle.

Lorsque l'inoculation du virus est faite à l'extrémité de la queue, les symptômes sont bien moins graves ; l'animal guérit presque toujours. L'opération est devenue un procédé de vaccination assez employé aujourd'hui.

(1) Nocard et Roux, Le microbe de la péripneumonie (*Ann. de l'Inst. Pasteur*, XII, 1898, p. 240).

(2) Loeffler et Frosch, Summarischer Bericht über die Ergebnisse der Untersuchungen der Kommission zur Erforschung der Maul und Klauenseuche bei dem Institute für Infektionskrankheiten in Berlin (*Centralbl. für Bakt.*, XXII, 1897, p. 257).

(3) Loeffler et Uhlenhuth, Ueber die Schutzimpfung gegen die Maul und Klauenseuche, im besonderen über die praktische Anwendung eines Schutzserums zur Bekampfung der Seuche bei Schweinen und Schafen (*Centralbl. für Bakt.*, XXIX, 1901, p. 19).

(4) Siegel, Ueber Immunisierungsversuche gegen Maul und Klauenseuche (*Deutsche med. Wochenschr.*, 1898, n°s 47 et 48, p. 749 et 766).

Tout, dans l'étude de la péripneumonie, indique bien nettement une maladie d'origine microbienne.

Arloing (1) a isolé de la sérosité des poumons péripneumoniques quatre Bactéries distinctes : un Bacille liquéfiant rapidement la gélatine, qu'il nomme *Pneumobacillus liquefaciens bovis* ; un Microcoque non liquéfiant, dont les colonies blanches ressemblent à des gouttes de cire, son *Pneumococcus gutta-cerei* ; un Microcoque donnant des colonies blanchâtres qui deviennent minces, ridées et plissées avec l'âge, son *Pneumococcus lichenoides* ; un autre Microcoque à colonies jaune orangé, *Pneumococcus flavescens*.

Pour lui, le *Pneumobacillus liquefaciens bovis* est bien l'agent essentiel de la péripneumonie. Il ne fait jamais défaut dans les lésions aiguës du poumon.

C'est un bâtonnet court, trapu, mobile. Il se colore bien aux couleurs d'aniline et se décolore par la méthode de Gram. Il peut se cultiver à l'air ou sans air.

Le bouillon se trouble uniformément. La gélatine est très vite liquéfiée.

Sur pomme de terre, le développement est abondant ; il forme une couche épaisse, d'un gris sale, visqueux. Le lait n'est pas coagulé et ne devient pas acide. Les cultures anciennes exhalent une odeur qui rappelle celle de la corne brûlée.

Les cultures sont virulentes : une petite quantité injectée dans le péritoine d'un cobaye détermine une péritonite rapidement mortelle. Mais rien, toutefois, ne rappelle les effets du virus péripneumonique.

Nocard et Roux (2) disent avoir réussi à isoler le microbe de la péripneumonie en cultivant du virus dans des sacs de collodion, remplis de bouillon, laissés pendant quinze ou vingt jours dans la cavité péritonéale de lapins. Les lapins maigrissent, se cachectisent, peuvent même mourir avant le jour fixé pour leur sacrifice. Leur sang, les sucs de leurs organes ne donnent rien en cultures ; les troubles observés sont dus à la diffusion de produits toxiques à travers la membrane du sac.

Les sacs ensemencés avec du virus, recueillis au moment voulu, renferment un liquide un peu louche, légèrement albumineux ; tandis que des sacs témoins, non ensemencés, ont conservé leur limpidité primitive.

Le liquide montre, à des grossissements considérables, 2 000 diamètres, et avec un puissant éclairage, une infinité de petits points, réfringents et mobiles, d'une telle ténuité qu'il est difficile, même en faisant agir les colorants, d'en déterminer exactement la forme.

On n'obtient aucun développement en remplaçant le lapin par le cobaye.

Il est facile d'obtenir des cultures successives de cet élément. Il s'agit bien d'un microbe spécial qui pullule dans ces conditions.

Ce microbe peut se cultiver en dehors de l'organisme dans du bouillon de panse de Martin (p. 231) additionné d'une petite quantité de sérum

(1) Arloing, Détermination du microbe producteur de la péripneumonie contagieuse du bœuf (*C. R. de l'Acad. des sc.*, CIX, 1889, p. 459). — Voy. aussi Nocard et Leclainche, Les maladies microbiennes des animaux.

(2) Nocard et Roux, Le microbe de la péripneumonie (*Ann. de l'Inst. Pasteur*, XII, 1898, p. 240).

de lapin ou de vache. Ce milieu conserve même mieux la virulence que les passages successifs dans le péritoine de lapins.

Après deux ou trois jours à 37°, le liquide limpide est devenu légèrement opalin ; par agitation, on met en évidence la production d'ondes soyeuses. Le microscope ne permet d'y déceler que de très fines granulations mobiles.

Dujardin-Beaumetz (1) a obtenu des cultures sur gélose en utilisant un milieu spécial. Il ajoute à du bouillon Martin 1gr,50 de gélose pour 100, chauffe à l'autoclave à 115°, filtre et répartit en tubes inclinés. Après refroidissement, l'eau de condensation est retirée avec une pipette et remplacée par un demi-centimètre cube environ de sérum stérile. Les tubes sont inclinés pendant vingt-quatre heures pour que le sérum imbibe bien leur surface.

En ensemençant la surface avec une goutte de sérosité péripneumonique ou de bouillon opalescent, on obtient, après trois ou quatre jours à 37°, de très fines colonies, visibles seulement à la loupe, réfringentes, transparentes, semblables à des gouttes de rosée. Ces colonies grandissent et, vers le cinquième jour, forment un petit disque blanchâtre de 1 millimètre de diamètre au maximum, présentant en son milieu un mamelon opaque. Ces colonies sont très adhérentes à la gelée, incrustées même dans sa surface par un petit prolongement médian.

Ces colonies se colorent très bien en masse par les méthodes habituelles et se décolorent par la méthode de Gram. En les dissociant, à de très forts grossissements, on ne peut distinguer qu'une fine poussière composée d'éléments irréguliers formés par l'agglomération de microbes qu'il est impossible de distinguer isolément.

L'inoculation aux vaches des cultures détermine des symptômes en tout semblables à ceux causés par le virus péripneumonique naturel.

Il semble qu'on soit bien réellement en présence du véritable microbe de la péripneumonie, microbe extrêmement ténu, à dimensions très inférieures à celle des microbes connus. Il passe facilement à travers les bougies filtrantes assez poreuses, telles que la bougie Berkefeld ou la bougie Chamberland F ; la bougie Chamberland B le retient. La sérosité pulmonaire doit être diluée dans la proportion de 1 à 2 p. 100 de bouillon Martin, filtré au préalable sur bougie. Le mélange est alors filtré sur bougie pour isoler le microbe.

Le *Pneumobacillus liquefaciens bovis* est un simple saprophyte de la muqueuse pulmonaire (2).

MICROCOCCUS DE LA PESTE BOVINE.

C'est encore un de ces microbes trop petits pour pouvoir être distingués aux plus forts grossissements. Nicolle et Adil-bey (3) ont montré qu'il traversait les bougies très poreuses, principalement la bougie Berkefeld mince et la bougie Chamberland F. Jusqu'ici on n'a pu obtenir,

(1) Dujardin-Beaumetz, Le microbe de la péripneumonie et sa culture. Thèse de Paris, 1900.

(2) Lignières, Le *Pneumobacillus liquefaciens bovis*, hôte normal du poumon sain (*Bull. de la Soc. de méd. vétér.*, 1896).

(3) Nicolle et Adil-bey, Études sur la peste bovine (*Ann. de l'Inst. Pasteur*, XIII, 1899, p. 319 ; XV, 1901, p. 715 ; XVI, 1902, p. 56).

de cultures. Les bovidés sont surtout exposés à cette maladie (typhus contagieux). Le chameau est très sensible, le mouton et la chèvre moins. Le porc, le cheval, les carnassiers et l'homme ne sont pas réceptifs; le cobaye, le pigeon et le lapin sont également réfractaires.

MICROCOCCUS DE LA POLIOMYÉLITE AIGUE

Cordier (1), dès 1888, a signalé l'origine infectieuse de la paralysie infantile ou poliomyélite aiguë de l'enfance et admis la possibilité de sa contagion pour les jeunes enfants.

Plus récemment, de nombreux exemples de manifestations épidémiques de cette affection ont été rapportés. Il en est qui sont bien nets. Harbitz et Schul (2) mentionnent un ensemble de 1053 cas dans plusieurs épidémies locales en Norvège pendant les années 1905 et 1906. Wickmann (3) compte environ 1000 cas en Suède en 1905. On en a en même temps observé aux États-Unis et au Canada. Krause (4) en Westphalie à Hagen et aux environs, en 1909, a relevé 436 cas avec 66 décès. Netter (5) en France, cite de petites épidémies.

Divers auteurs ont signalé la présence de Micrococques dans les centres nerveux des malades. Harbitz et Schul ont trouvé dans le liquide céphalo-rachidien un diplocoque très analogue au *Diplococcus crassus*, le Pseudo-méningocoque de Jaeger. Krause et Meinicke (6) n'ont obtenu que des résultats négatifs.

Flexner et Lewis (7), en même temps Levaditi (8), ont montré que le virus était de la catégorie des virus filtrants à microbes très petits et invisibles. Du liquide provenant du broyage de la moelle épinière, filtré sur bougie Berkefeld, se cultive dans du bouillon additionné de sérum ou de liquide d'ascite ; à 37° il se produit un trouble manifeste. Dans le dépôt minime obtenu par centrifugation, on trouve de très petits granules qui se colorent aux méthodes ordinaires.

En injectant dans le cerveau de singes des émulsions de moelle, Flexner et Lewis (9) ont déterminé la production de symptômes rappelant ceux de la maladie humaine, des accidents de paralysie affectant surtout le train postérieur, s'étendant ensuite aux membres supérieurs, au tronc, à la nuque. L'affection est transmissible en série. Les autres animaux de laboratoire paraissent réfractaires.

(1) Cordier, *Lyon médical*, 1888, p. 5 et 48.

(2) Harbitz et Schul, Pathologische-anatomische Untersuchungen uberakute Poliomyelitis und verwandte Krankheiten von den Epidemien in Norvegen, 1903-1906.

(3) Wickmann, Beiträge zur Kenntniss der Heine-Medinschen Krankheit. Berlin, 1907.

(4) Krause, Zur Kenntniss der westphalischen Epidemie von Kinderlähmung (*Deutsche med. Wochenschr.*, 1909, n° 42, p. 1822).

(5) Netter, *Soc. méd. des hôp.*, novembre 1909.

(6) Krause et Meinicke, Zur Aetiologie der akuten Kinderlähmung (*Deutsche med. Wochenschr.*, 1909, p. 1825).

(7) Flexner et Lewis, The nature of the virus of epidemic Poliomyelitis (*Journ. of the Amer. med. Assoc.*, 1909, LIII, p. 2095).

(8) Levaditi, Le virus de la poliomyélite aiguë (*Presse méd.*, 21 mai 1910).

(9) Flexner et Lewis, The transmission of acute poliomyelitis to Monkeys (*Journ. of the Amer. med. Assoc.*, 1909. LIII, p. 1639, 1913, 1910 ; LIV, p. 535).

MICROCOCCUS DE LA GOURME DU CHEVAL

(*Sreptococcus equi de Schütz.*)

La *gourme* est une maladie qui frappe surtout le cheval et, à un moindre degré, l'âne et le mulet. Les jeunes animaux y sont principalement sujets; une première atteinte ne confère le plus souvent qu'une immunité temporaire.

Les symptômes et l'évolution de l'affection sont des plus variés. Elle peut n'être qu'un simple exanthème. Le plus souvent, elle se traduit par un catarrhe des voies respiratoires antérieures, surtout de la muqueuse nasale, avec jetage séreux ou purulent; les ganglions lymphatiques voisins se gonflent, d'où le nom de *gourme*, et suppurent dans bien des cas. La maladie peut même se généraliser, prendre les caractères d'une véritable septicémie, avec abcès métastatiques dans les organes et complications sur les séreuses.



Fig. 231. — Pus gourmeux du cheval.

L'agent de contage paraît être un Streptocoque décrit et étudié la première fois par Schütz (1), peu après par Sand et Jensen (2), puis par Pœls (3). Ces travaux sont bien exposés dans une revue critique de Lüpke (4).

Il se rencontre dans le pus des abcès gourmeux en nombreuses chaînettes tantôt courbes, formées de trois ou quatre microcoques, tantôt très longues et ondulées, ou même sous forme d'éléments isolés (fig. 231). Les éléments isolés sont arrondis; ceux des chaînettes sont plutôt ovales, à grand axe transversal.

Tous ces éléments se colorent facilement aux procédés ordinaires et *restent colorés* par la méthode de Gram.

Schütz ne l'a obtenu que difficilement en culture et presque exclusi-

(1) Schutz, Der Streptococcus der Druse der Pferdes (*Arch. für Thierheilk.*, XIV, 1888, p. 172).

(2) Sand et Jensen, Die Actiologie der Druse (*Deutsche Zeitschr. für Thiermed.*, XIII, 1888, p. 437).

(3) Poels, Die Mikrokokken der Druse des Pferdes (*Fortschr. der Med.*, VI, 1888, p. 4).

(4) Lupke, Die ursächliche Erreger der Drüsenkrankheit des Pferdes (*Centralbl. für Bakt.*, V, 1889, p. 44).

vement dans le bouillon. D'après Nocard (1), il pousse sur tous les milieux, aussi bien en aérobie qu'en anaérobie.

Dans le *bouillon*, surtout dans le *bouillon glycériné*, il se forme dans le liquide, qui reste limpide, de petits flocons blancs qui se sédimentent lentement en un dépôt léger.

Sur *gélatine*, en *piqûre* seulement, il se développe, le long de la piqûre, de petites colonies rondes, blanches, toujours minimes ; il ne se produit pas de liquéfaction

Sur *gélose*, en *strie*, les cultures restent aussi minimes, lenticulaires, presque transparentes ; le développement est plus abondant, floconneux, dans le liquide de condensation qui peut se trouver au fond du tube. En *piqûre*, les colonies qui poussent en profondeur sont notablement plus fortes.

Sur *sérum*, la culture est plus abondante ; il se forme au début des colonies arrondies assez transparentes, qui confluent au bout de quelques jours et forment une bande assez épaisse, d'un blanc grisâtre, à reflets nacrés. Les microcoques de ces cultures sur sérum montrent souvent une petite capsule dans les préparations colorées.

Le *lait* est coagulé plus ou moins vite.

L'inoculation sous-cutanée de cultures pures au cheval détermine de véritables abcès gourmeux. L'inoculation intraveineuse lui conférerait l'immunité.

Le lapin et surtout le cobaye paraissent en partie réfractaires.

Le premier est tué par l'inoculation intraveineuse de doses massives, jusqu'à 3 centimètres cubes ; le second ne succombe qu'à l'inoculation intrapéritonéale de grandes quantités de culture. Les inoculations sous-cutanées ne leur font rien.

La souris blanche est très sensible ; c'est l'animal de choix. En inoculation sous-cutanée, on observe un abcès au point d'inoculation et souvent les mêmes manifestations métastatiques que dans la maladie du cheval. Les mêmes lésions se produisent avec des produits gourmeux.

Beaucoup de ces caractères rappellent ceux du *Streptocoque pyogène*, dont cette espèce se rapproche. Pour Cappeletti et Vivaldi (2), d'après sa morphologie, sa virulence à l'égard des animaux, ses propriétés biologiques, sa manière de se comporter vis-à-vis du sérum de Marmorek, le *Streptocoque equi* ne serait qu'une variété du *Streptocoque pyogène*. D'autres observateurs n'ont obtenu aucun résultat curatif avec le sérum de Marmorek. Pour Lignières (3), ce microbe est à distinguer nettement du *Streptocoque pyogène* ; on doit lui rapporter le *Streptocoque de la pneumo-entérite* de Galtier ; le *Streptocoque de la gourme* ne serait toutefois pas l'agent exclusif des pneumonies contagieuses du cheval. Il viendrait compliquer d'autres processus d'infection, la pasteurellose en particulier ; son rôle se réduirait le plus souvent à celui d'agent d'infection secondaire.

(1) Nocard et Leclainche, Les maladies microbiennes des animaux, 3e édit., 1903, II, p. 278.

(2) Cappeletti et Vivaldi, Streptococcus equi (*Annali d'Igiene sperimentale*, VIII, 1898, p. 104).

(3) Lignières, Contribution à l'étude des pneumonies du cheval (*Recueil de méd. vétér.*, 30 juin et 30 août 1899). — Contributions à l'étude et à la classification des septicémies hémorragiques. Buenos-Ayres, 1900.

MICROCOCCUS DE LA NÉCROSE PROGRESSIVE DU TISSU CONJONCTIF DE LA SOURIS Koch.

En injectant à des souris de maison du sang putréfié, Koch(1) a déterminé une affection rapidement mortelle, due à l'action combinée d'un Bacille et d'un Microcoque. Il a pu isoler ce dernier par inoculation d'une goutte de sang prise sur la première souris à une souris de champ, qui présente la particularité d'être réfractaire à l'action du Bacille que nous étudierons plus loin sous le nom de *Bacillus murisepticus*. Au point d'inoculation, il se produit une gangrène à marche rapide, qui envahit progressivement les tissus voisins et amène d'habitude la mort en trois jours. Le parasite ne se rencontre ni dans le sang de la circulation générale, ni dans les organes internes ; on le trouve exclusivement dans la région envahie.

Ce sont des cellules rondes, mesurant 0,5 μ de diamètre, formant de longues chaînes à courbures élégantes.

MICROCOCCUS DE LA SUPPURATION PROGRESSIVE DU LAPIN Koch.

Isolé par Koch (*loc. cit.*) du sang putréfié par injection sous-cutanée au lapin. Il se forme à l'endroit de la piqûre une tuméfaction rapide, puis un abcès qui fuse dans les parties voisines. La mort arrive au bout de douze jours. Le pus inoculé à un autre lapin produit la même maladie. Les parois de la collection purulente sont recouvertes d'une couche épaisse de Bactéries très petites, de 0,15 μ de diamètre; on trouve également de grosses Zooglées fusiformes entre les vaisseaux du tissu conjonctif qui environne l'abcès. Le pus du centre de l'abcès n'en contient pas, non plus que le sang.

MICROCOCCUS DE LA PYÉMIE DU LAPIN Koch.

Koch (*loc. cit.*) a causé chez le lapin une infection purulente généralisée, par l'injection, sous la peau, d'un liquide de macération. On observe d'abord de l'œdème au point d'inoculation, puis une infiltration purulente et la mort après trois ou quatre jours. A l'autopsie, outre les lésions locales, on trouve des abcès métastatiques dans le poumon et le foie et un très fort gonflement de la rate. Dans les vaisseaux, on rencontre des amas compacts de *Micrococcus* ronds, de 0,25 μ de diamètre, englobant souvent des globules rouges; il se forme ainsi des thrombus qui peuvent remplir les capillaires.

MICROCOCCUS DE LA SEPTICÉMIE CONSÉCUTIVE AU CHARBON Charrin.

En inoculant au lapin du sang d'un de ses congénères mort depuis

(1) Koch, Ueber die Aetiologie der Wundinfectionskrankheiten. Leipzig, 1878. — Zur Untersuchung von pathogenen Organismen (*Mitt. aus dem kaiserl. Gesundheitsamte*, I, 1188). — Voy. aussi Gaffky, Ueber experimentell erzeugte Septicämie *Ibid.*).

peu de temps du charbon, Charrin (1) a déterminé une septicémie amenant la mort de dix-huit à quarante-huit heures. Les principaux caractères sont, à l'autopsie, un œdème rougeâtre au point d'inoculation et un fort gonflement de la rate. On trouve très abondamment, dans le sang de tous les organes, des *Micrococcus* ronds ou légèrement ovoïdes, de 1 μ à 2 μ de diamètre, disposés en longs chapelets ayant jusqu'à vingt articles. C'est un aérobie légèrement mobile, se cultivant très bien dans le bouillon, mais y perdant très vite sa virulence. Les cultures meurent à 45°.

La maladie se transmet au lapin, au moineau et quelquefois au rat. Le chien, la poule, le cobaye, la grenouille y résistent. Le *Micrococcus de la septicémie du lapin* de Koch tue au contraire facilement les poules.

MICROCOCCUS DE LA SEPTICÉMIE DU LAPIN Koch.

En inoculant à des lapins du sang de bœuf putréfié, Davaine (2) avait déterminé chez ces animaux une septicémie à forme toute spéciale. Koch (3) a reproduit la même affection par inoculation de macéré de viande putréfiée. Après la mort, qui survient de un à trois jours, on trouve un peu d'œdème autour du point d'inoculation et un fort gonflement de la rate. Dans les capillaires des organes, surtout dans les glomérules du rein, on rencontre des amas de *Micrococcus*, obturant le calibre des vaisseaux. Ces éléments sont ovoïdes et mesurent de 0,8 μ à 1 μ dans leur grand diamètre. La sérosité de l'œdème et le sang contiennent de ces Bactéries et transmettent la maladie aux lapins et aux souris, par inoculation ; il faut injecter sous la peau une quantité de sang assez forte, de deux à dix gouttes d'après Koch. On n'a que peu de détails sur les cultures de cette espèce ; elle se développe bien sur gélatine, sans causer de liquéfaction.

Les symptômes occasionnés par l'inoculation aux lapins sont identiques à ceux que détermine, chez ces animaux, le *Bacille du choléra des poules*. D'après Davaine, cependant, les poules seraient réfractaires à l'espèce que nous étudions.

Daremberg (4) a décrit une septicémie, très voisine ou identique, qu'il a obtenue en inoculant au lapin des produits tuberculeux. La mort arrive après vingt-quatre à quarante heures. Les symptômes ressemblent à ceux décrits par Koch. La maladie est épidémique et se transmet facilement aux lapins du voisinage. Les cobayes résistent plus que les lapins. Le sang et les organes des lapins morts contiennent des *Micrococcus* ovoïdes, disposés en chaînettes ou en amas, rarement par deux ou quatre, qui se cultivent sur gélatine sans la liquéfier. Les cultures conservent leur virulence après avoir été chauffées à 55°. L'atténuation se fait très rapidement ; les deuxièmes cultures sont déjà moins actives que les premières.

Lucet (5) a observé une affection semblable décimant les lapins d'un

(1) Charrin, Note sur une septicémie (*Soc. de Biol.*, 2 août 1884).

(2) Davaine, Recherches sur quelques questions relatives à la septicémie (*Bull. de l'Acad. de méd.*, 1872, p. 907 et 976).

(3) Koch, Ueber die Aetiologie der Wundinfectionskrankheiten. Leipzig, 1878.

(4) G. Daremberg, Note sur une septicémie du lapin (*Soc. de Biol.*, 1886, p. 457).

(5) Lucet, Sur une nouvelle septicémie du lapin (*Ann. de l'Inst. Pasteur*, 1889, n° 8).

clapier. Les lapins atteints maigrissent, tombent en somnolence, se ramassent en boule, puis meurent. L'autopsie montre un foie volumineux, une rate hypertrophiée, noire ; les autres organes sont le plus souvent normaux.

Le sang et le suc des organes renferment en très grande abondance un petit Microcoque immobile, isolé ou par couples, de 0,7 μ à 0,9 μ de diamètre, se colorant facilement, mais *perdant la couleur* par la méthode de Gram.

Il est facile d'en obtenir des cultures vers 35°; la croissance devient lente à 18°. Le bouillon se trouble et montre, en quelques jours, un voile épais qui se dissocie. Sur gélose, il se forme une culture blanche, épaisse, poisseuse.

Les cultures fraîches sont très virulentes et tuent rapidement les lapins. La virulence et la puissance végétative se perdent vite au contact de l'air.

On devra peut-être rapprocher cette espèce des pasteurelloses.

MICROCOCCUS SALIVARIUS SEPTICUS Biondi.

Biondi (1), dans ses recherches sur les Bactéries de la salive, ne l'a rencontré qu'une seule fois, dans la salive d'une femme malade de fièvre puerpérale. Cette salive, inoculée sous la peau de souris, cobayes et lapins, les tuait en un laps de temps variable de quatre à six jours. On leur trouve de nombreux coccus dans le sang et de petits amas dans les tissus, qui ne présentent aucune trace d'inflammation dans leur voisinage. Le sang de ces animaux, inoculé à d'autres, les fait périr avec les mêmes symptômes.

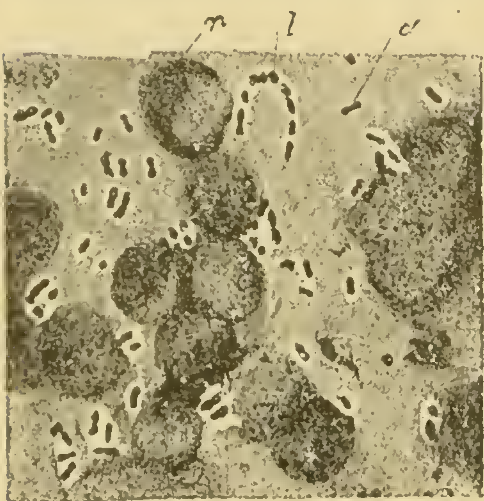


Fig. 232. — Diplocoques capsulés de la salive (d'après Biondi).

Les coccus sont régulièrement sphériques, isolés, réunis par deux ou en petits amas. Ils se colorent bien par les couleurs d'aniline et *restent colorés* par la méthode de Gram (fig. 232). Ils se cultivent facilement sur les milieux habituels, à part le lait et les pommes de terre. Les cultures se font à l'air ou dans une atmosphère d'azote.

En cultures sur plaques, on obtient des colonies circulaires grisâtres, qui ne liquéfient pas la gélatine. En piqûre dans un tube de gélatine, il se forme, dans le trajet de l'aiguille, de petites colonies rondes, accolées les unes aux autres, et presque rien à la surface.

Par inoculation de produit de cultures, on obtient les mêmes résultats qu'avec le sang contaminé ; seulement, il faut alors user de beaucoup plus fortes doses. Il faut inoculer la valeur de quatre à six cultures pour arriver aux troubles occasionnés par une ou deux gouttes de sang. Ce *Micrococcus* est certainement à rapprocher du *Pneumocoque*.

(1) Biondi, Die pathogenen Microorganismen der Speichels (*Zeitschr. für Hygiene*, II, 2e p., p. 194).

MICROCOCCUS SALIVARIUS PYOGENES Biondi (1).

(*Staphylococcus salivarius pyogenes.*)

On obtient souvent une suppuration locale après injection sous-cutanée de salive chez les animaux d'expérience. Il se forme au point choisi, au bout de trois ou quatre jours, un gonflement qui devient fluctuant. Dans le pus, on trouve toujours, au milieu des globules de pus, un *Micrococcus* disposé en petits amas, en tout semblable aux *Micrococcus pyogenes aureus* et *Micrococcus pyogenes albus*. Ce pus, injecté à d'autres animaux, produit les mêmes symptômes que ceux déterminés chez les premiers par l'injection de salive. Après vingt-quatre heures, il se forme, au point d'inoculation, un gonflement très dur, très douloureux à la pression. Au quatrième jour, le centre devient plus mou et du sixième au septième on perçoit une fluctuation très nette. L'abcès ouvert laisse sortir un pus jaune, crémeux, contenant en quantité les coccus signalés précédemment.

Ce sont des coccus sphériques de petite taille, de 0,2 μ à 0,5 μ de diamètre, isolés ou en petits amas, mais jamais en diplocoques ou en chaînes. Ils *se colorent* très bien par la méthode de Gram. On ne les rencontre jamais dans le sang.

Ils se cultivent bien sur la gélatine qu'ils liquéfient lentement.

En cultures sur plaques, les colonies apparaissent au bout de deux à trois jours; elles sont rondes, à bords nets, d'un blanc opaque. En cinq ou six jours, elles ont atteint leur maximum, puis liquéfient lentement la gélatine environnante.

En piqûre dans un tube de gélatine, à 12°-14°, le développement se fait d'abord à la surface, puis dans le canal. Au huitième jour, il s'est formé un entonnoir de liquéfaction qui augmente peu à peu. Le liquide est trouble et tient en suspension de petits grumeaux, d'apparence graisseuse, qui se rassemblent surtout à la pointe de l'entonnoir. A la surface de la gélatine liquéfiée se trouve une mince pellicule très visqueuse.

Sur gélose, la croissance est très rapide. La culture est déjà visible en vingt-quatre heures à 35°. Elle forme au bout de quelque temps le long de la strie une bande épaisse qui peut atteindre 1 centimètre de large. Au centre, cette culture a une belle couleur orange; la partie périphérique est blanche. La couleur jaune est moins intense que celle du *Micrococcus pyogenes aureus*.

Sur sérum, on obtient une colonie blanchâtre opaque. Le bouillon est troublé en deux heures à 35°, puis laisse voir après quelque temps un épais dépôt blanc. Le lait est bientôt coagulé; la caséine se précipite en gros flocons.

Les cultures sont virulentes; leur inoculation produit les mêmes effets que celles du pus. Elles sont tout aussi actives après de nombreuses générations; conservées pendant six mois, elles ont gardé toute leur virulence, qui résiste même à une dessiccation prolongée.

Ces particularités diffèrent peu de celles qui appartiennent aux *Micrococcus pyogenes aureus* et *Micrococcus pyogenes albus*, dont Vignal (2)

(1) Biondi, *Loc. cit.*

(2) Vignal, Recherches sur les microorganismes de la bouche (*Arch. de physiol.*, 1886, n° 8).

a du reste signalé la présence dans la salive. D'après Biondi, cependant, la distinction est très nette. Le *Micrococcus salivarius pyogenes* liquéfie plus lentement la gélatine ; la liquéfaction ne commence à 12°-14° qu'au vingtième jour ; à ce moment, les autres ont déjà liquéfié une bonne partie de la gelée. La coloration du premier est d'un jaune d'or plus clair que celle du *Micrococcus pyogenes aureus* : il forme souvent à la surface de la gélatine liquéfiée une pellicule qui ne s'observerait pas avec les autres. Enfin les coccus sont plus isolés dans le pus. Après avoir étudié un grand nombre de cultures de *Micrococcus pyogenes aureus*, on arrive à se convaincre que les caractères cités sont loin d'être aussi nettement différentiels. La liquéfaction déterminée par cette dernière espèce ne marche souvent que lentement, lorsqu'on se sert, pour inoculer, d'une culture de troisième ou quatrième génération ; la coloration des colonies sur gélose est aussi moins vive. Enfin il arrive fréquemment d'observer sur la gélatine liquéfiée par le *Micrococcus pyogenes aureus* cette pellicule très visqueuse, adhérant au fil de platine et se laissant étirer en longs fils, que Biondi donne comme si caractéristique pour son espèce. Des nouvelles recherches sont nécessaires pour élucider la question et établir la véritable nature des espèces étudiées par Biondi.

MICROCOCCUS DANS LA SCARLATINE.

Coze et Feltz (1) ont signalé, en 1872, la présence de *Micrococcus*, de 0,6 μ de diamètre, dans le sang de malades atteints de scarlatine. Pohl Pincus (2) dit avoir trouvé, en 1883, des coccus de 0,5 μ chez des scarlatineux, à la surface de l'épiderme desquamé et sur le voile du palais dans un cas d'angine.

La présence de Streptocoques très semblables à ceux du pus ou de l'érysipèle a été signalée par de nombreux observateurs dans diverses lésions de la scarlatine. Il n'est guère possible, actuellement, de les distinguer nettement du *Streptocoque pyogène* dont les caractères sont, on le sait, assez variables. Fraenkel et Freudenberg (3) ont obtenu des cultures d'un de ces Streptocoques avec le suc du rein, du foie et de la rate, dans trois cas mortels de scarlatine. Babès (4) a retrouvé, dans dix-huit cas sur vingt mortels de scarlatine, un microbe en chaînettes qu'il regarde comme une simple variété du Streptocoque du pus. Raskin (5) décrit un *Micrococcus*, qui se rencontre principalement dans les leucocytes et dans l'épiderme desquamé et diffère surtout du *Streptocoque pyogène* parce qu'il ne se développe pas sur gélatine à la température de la chambre.

Lœffler (6) et plus tard Würtz et Bourges (7), étudiant les fausses

(1) Coze et Feltz, Recherches cliniques et expérimentales sur les maladies infectieuses. Paris, 1872.

(2) Pohl Pincus, Befund and der Epidermisschuppen von Scarlachkranken in der Shalungperiode (*Centralbl. für die med. Wissensch.*, 1883, n° 36).

(3) Fraenkel et Freudenberg, *in* Cornil et Babès, Les Bactéries, 3e édit., t. II, p. 265.

(4) Babès, *in* Cornil et Babès, Les Bactéries, 3e édit., II, p. 266.

(5) Raskin, Ueber die Aetiologie des Scarlachs (*Centralbl. für Bakt.*, V, 1889).

(6) Lœffler, Untersuchungen über die Bedeutung der Mikroorganismen für den Enstehung der Diphterie (*Mitth. aus dem kaiserl. Gesundheitsamte*, 1884).

(7) Würtz et Bourges, Recherches bactériologiques sur l'origine pseudo-diphtéritique de la scarlatine (*Arch. de méd. expér.*, 1890, p. 341).

membranes de l'angine scarlatineuse, y rencontrent de ces mêmes Streptocoques, seuls ou avec le Bacille de la diphtérie dans les cas graves et presque toujours mortels.

Il semble ressortir de là que les Bactéries pyogènes jouent un rôle important dans la marche et surtout la gravité de la scarlatine.

En 1886, à propos d'une épidémie très meurtrière de scarlatine qui sévit sur Londres, Power (1) crut pouvoir rattacher cette maladie à une affection contagieuse développée chez les vaches et expliquer la transmission à l'homme par l'usage du lait cru provenant d'animaux malades. La maladie bovine fut étudiée par Klein (2); les vaches qui en étaient atteintes présentaient, sur les mamelles et les trayons, des ulcérations qui, inoculées à des veaux, se reproduisaient identiques. Souvent la maladie devenait plus grave et les animaux succombaient avec des symptômes rappelant ceux de l'infection purulente. Les ulcérations de la vache contenaient en grand nombre des diplocoques isolés ou unis en chaînes de deux à vingt couples.

Klein a pu cultiver ce *Micrococcus*, en inoculant des tubes de gélatine et de gélose avec de la lymphe recueillie dans la partie profonde de l'ulcération. Il a observé, après trois jours à la température ordinaire, de petites sphères blanches tout le long de la piqûre et, à la surface, une petite colonie, aplatie, n'atteignant pas un grand développement ; la gélatine n'était pas liquéfiée. Cultivée dans le lait, cette Bactérie le coagule en deux jours à 35° et le coagulum reste ferme.

Les cultures ont été inoculées à des veaux ; l'un d'eux est mort au bout de vingt-six jours. Le point d'inoculation était le siège d'un gonflement marqué; les ganglions voisins étaient très tuméfiés. L'autopsie a montré de la péricardite et de la péritonite avec sérosité purulente, le foie hyperémié et augmenté de volume, les poumons en partie hépatisés, à exsudat renfermant une quantité de diplocoques. Le pharynx était rouge et gonflé, la muqueuse de l'intestin grêle pâle et les plaques de Peyer tuméfiées. Le sang du cœur, mis en culture, a donné des chaînettes de Micrococques.

Ce *Micrococcus*, regardé comme spécifique par Klein, ne serait, d'après des données plus récentes, que le *Streptocoque pyogène* et la maladie de la vache une forme de cowpox.

Jamieson et Edington (3) ont repris cette étude sur l'homme, à Édimbourg. Ils ont trouvé dans le sang et dans la peau de scarlatineux huit espèces de Bactéries, pour la plupart communes partout. Comme nouvelles et en rapport plus ou moins direct avec l'affection, Edington décrit deux *Micrococcus* et un *Bacillus*. L'un des Micrococques, qu'il appelle *Streptococcus rubiginosus*, n'est pas infectieux et n'apparaît que vers la fin de la maladie. Le second, *Diplococcus scarlatinæ*, donne sur la gélatine des colonies blanc jaunâtre qui ne liquéfient pas ; il n'est pas pathogène. Le *Bacillus* semble à Edington le véritable agent de conta-

(1) Power, Milk-Scarlatina (*London Report of the Med. Officer of local-Government Board for 1885-1886*, n° 8, p. 73).

(2) Klein, The Etiology of scarlet Fever (*Proceedings of the Royal Society*, London, XLII, 1887).

(3) Jamieson et Edington, Observations on a method of prophylaxis and on investigation into the nature of the contagium of scarlet fever (*The British med. Journ.*, 14 juin 1887, p. 1262).

gion ; il le nomme *Bacillus scarlatinæ*. Ce sont des bâtonnels mobiles, mesurant de 1,2 μ à 1,4 μ de long sur 0,4 μ de large. Ils forment dans leur intérieur des spores ovales de 1 μ à 1,3 μ de long sur 0,6 μ à 0,75 μ de large, entourées d'une sorte de capsule se colorant faiblement avec une solution étendue de bleu de méthylène. Cultivé sur bouillon, ce Bacille y forme un voile. Il liquéfie rapidement la gélatine ; le liquide, trouble au début, devient peu à peu limpide. Sur pomme de terre, il donne en vingt-quatre heures à 18° une colonie jaune-citron qui envahit toute la surface. Cette espèce se retrouve toujours sur les cultures faites avec l'épiderme desquamé, à partir du vingt-cinquième jour. L'inoculation à des lapins et des cobayes a produit une élévation de température et une rougeur érythémateuse assez étendue. Un jeune veau, auquel avait été faite une injection sous-cutanée de culture, est mort avec de la fièvre ; son sang contenait les mêmes Bacilles. Chez un autre, Edington a observé un gonflement du voile du palais et une inflammation de la langue.

Peu après, Smith (1) annonçait avoir trouvé, dans des cultures de sudamina d'un homme sain, une Bactérie identique au *Bacillus scarlatinæ* d'Edington. Une commission, nommée par la Société médico-chirurgicale d'Édimbourg, pour examiner les expériences d'Edington, a obtenu des résultats tout à fait contraires à ceux que cet auteur avait énoncés. Le *Bacillus scarlatinæ* n'a aucune action pathogène sur les veaux ; sa présence sur la peau de l'homme est purement accidentelle ; il est peut-être même identique au *Bacillus subtilis*, si répandu. Enfin, le *Streptococcus rubiginosus* est identique au Microcoque décrit par Klein ; c'est le *Streptocoque pyogène*.

Picheney (2) croit, comme Klein, pouvoir rattacher la scarlatine de l'homme à une affection de la vache, mais n'apporte aucune preuve concluante à l'appui de son opinion.

C'est encore un Streptocoque qu'incrimine Kurth (3) : il le dénomme *Streptococcus conglomeratus*. On ne peut guère le considérer que comme une des variétés du Streptocoque pyogène.

Il en est de même du Streptocoque décrit par d'Épine (4).

Il semble cependant qu'un Streptocoque joue ici un rôle important. Il se rencontre en effet fréquemment chez les scarlatineux. On le trouve en abondance sur la muqueuse du pharynx et à la surface des amygdales, régions où se produisent les premières manifestations objectives de l'infection scarlatineuse. On l'isole souvent du sang du cœur et de la moelle des os (5). Les cultures douées de virulence déterminent les mêmes effets que celles du *Streptocoque pyogène*. Pour bien des observateurs, il se distinguerait nettement de ce dernier. On a vu (p. 167) qu'en partant de ces idées Moser a obtenu un sérum antistreptococ-

(1) Smith, Note on the so-called Bacillus scarlatinæ of Drs. Jamieson and Edington (*The British med. Journ.*, 9 juillet 1887).

(2) Picheney, Recherches sur l'origine bovine de la scarlatine (*C. R. de l'Acad. des sc.*, CV, 1887, p. 677).

(3) Kurth, Ueber die Unterscheidung des Streptokokken, und über das Vorkommen derselben, inbesondere des Streptococcus conglomeratus, bei Scharlach (*Arb. aus dem kaiserl. Gesundheitsamte*, VII, 1891, p. 389).

(4) D'Épine, Le Streptocoque scarlatineux (*C. R. de l'Acad. des sc.*, 6 mai 1895).

(5) Baginsky et Sommerfeld, Bakteriologische Untersuchungen bei Scarlatina. Ein konstanter Bakterienbefund bei Scharlach (*Arch. für Kinderheilk.*, 1902).

cique spécial qui lui aurait donné de très bons résultats dans le traitement de la scarlatine, résultats confirmés du reste par d'autres observateurs (1), alors que l'emploi du sérum de Marmorek n'aurait rien fourni de satisfaisant. Ce sérum agglutinerait nettement le Streptocoque du sang des scarlatineux, ce que n'arrivent pas à produire les autres sérums antistreptococciques. Ce sont toutefois des questions qui demandent de nouvelles recherches ; des observations de Dopter infirment les résultats d'agglutination (2).

On voit par ces données que l'étiologie de cette affection, si éminemment contagieuse et évidemment d'origine bactérienne, est encore loin d'être élucidée.

On observe souvent, dans le cours de la scarlatine, des infections secondaires, dues la plupart du temps à l'une ou à l'autre des espèces pyogènes ordinaires; ce sont ces espèces que Pinna et Marini (3) ont exclusivement rencontrées dans les desquamations des scarlatineux.

MICROCOCCUS DANS LA VARIOLE ET DANS LE VACCIN.

Coze et Feltz (4), en 1866, avaient reconnu que le sang des varioleux renfermait de très petites Bactéries réunies en chapelets. Ils en ont plus tard (5) précisé les caractères et les ont retrouvées dans la lymphe d'une pustule non purulente. A côté de *Micrococcus* de 0,4 μ de diamètre, ils signalent des *Bacilles* de 1,2 μ de longueur.

Cohn (6) a décrit, en 1872, sous le nom de *Micrococcus vaccinæ*, des Bactéries rondes, réunies en chaînes ou en petits amas, qu'il a rencontrées dans la lymphe des pustules vaccinales de l'homme et d'animaux; il en a observé de semblables dans les capillaires du foie et du rein des varioleux.

Cette croyance à la nature bactérienne de la vaccine et, partant, de la variole avait été solidement appuyée par les expériences concluantes de Chauveau, qui, en 1868, avait démontré que le principe virulent du vaccin ne réside pas dans le liquide, mais uniquement dans les granulations qu'il tient en suspension. Du vaccin filtré sur porcelaine est toujours inoffensif.

Toutefois, il faut reconnaître qu'au point de vue bactériologique la question n'est pas plus avancée aujourd'hui ; le microbe actif reste encore à découvrir.

Les diverses affections varioleuses, variole de l'homme, variole de la vache ou cowpox, variole du cheval ou horsepox qui semble être l'affection initiale, la plus virulente, et même variole du mouton ou clavelée, sont-elles déterminées par un seul agent ou sont-elles des types patho-

(1) Charlton, Employment of an antistreptococcus serum in severe cases of scarlet fever (*Montreal med. Journ.*, octobre 1902).

(2) Besredka et Dopter, Contribution à l'étude du rôle des Streptocoques au cours de la scarlatine (*Ann. de l'Inst. Pasteur*, 1904, XVIII, p. 373).

(3) Pinna et Marini, Bakteriologisches Studium über die Schuppen der Masernkranken (*Il Policlinico*, 1900, n° 7).

(4) Coze et Feltz, Recherches expérimentales sur la présence des infusoires et l'état du sang dans les maladies infectieuses. Strasbourg, 1866.

(5) Coze et Feltz, Recherches cliniques et expérimentales sur les maladies infectieuses. Paris, 1872.

(6) Cohn, *Virchow's Arch.*, LV, 1872.

logiques différents à tous points de vue ? C'est là une question qui n'est pas encore tranchée (1).

Variole. — Cornil et Babès (2) trouvent des Micrococques dans les lacunes du corps muqueux des papules varioleuses.

Guttmann (3) a isolé du contenu de pustules de variole les *Micrococcus pyogenes aureus* et *Micrococcus cereus albus*; des pustules de varicelle lui ont fourni en outre une troisième espèce nouvelle, *Micrococcus viridis flavescens*.

Marotta (4) a trouvé, dans le contenu d'une pustule de variole, un coccus disposé en tétrades, qu'il considère comme spécifique. Par inoculation de cultures pures de la septième génération à des veaux, il aurait obtenu des pustules vaccinales typiques. Les caractères des cultures rappellent tous ceux du *Micrococcus pyogenes aureus*; il y a certainement eu confusion.

Hlava (5) est arrivé aux mêmes résultats que Guttmann; il a isolé, de pustules de variole, les *Micrococcus pyogenes*, *M. pyogenes albus*, *M. viridis flavescens*, *M. cereus albus*. Nous savons qu'aucune de ces espèces ne peut être regardée comme spécifique.

Les résultats des recherches de Garré (6) sont plus sérieux, mais encore loin de trancher définitivement la question. Il a obtenu, de pustules de variole et de vaccine, un *Micrococcus* qui lui paraît spécifique et deux Bacilles en courts bâtonnets, n'ayant aucune action sur l'organisme.

Les coccus de la première espèce sont très petits et se cultivent facilement. Ils donnent sur gélatine une culture grisâtre épaisse, homogène; le milieu n'est pas liquéfié. Sur gélose, ils forment des taches d'un blanc sale mat, ne paraissant pas homogènes, mais formées par de petits flocons assemblés. Le lait est rapidement coagulé et le sérum solide liquéfié. L'inoculation de ces cultures au veau produit de belles pustules qui donnent les mêmes coccus; le vaccin ordinaire n'a plus de prise sur ces individus. Sur l'homme, on obtient de semblables pustules, mais aucune immunité pour le vaccin. Les injections sous-cutanées de ces cultures ne déterminent aucune inflammation.

Protopopoff (7) considère comme la Bactérie spécifique un Streptocoque qu'il a rencontré dans cinq cas d'orchite varioleuse, sur six qu'il a examinés. Cette espèce aurait, d'après lui, une culture dans le bouillon très particulière. Elle y formerait, dans le fond et sur les parois du vase, en deux ou trois jours, de petits flocons grisâtres composés de très longues chaînettes. C'est, je l'ai dit plus haut (p. 457), un aspect de culture que donne très souvent le *Streptocoque pyogène* lorsqu'on ense-

(1) Galli-Valerio, Affections varioleuses, état actuel des études sur les rapports qui existent entre elles (*Centralbl. für Bakt.*, XXV, 1899, p. 380 et 424).

(2) Cornil et Babès, Note sur le siège des Bactéries dans la variole, la vaccine et l'érysipèle (*Soc. méd. des hôp.*, 10 août 1883); — Les Bactéries, 3e édit., t. II, p. 255.

(3) Guttmann, Bakteriologische Untersuchungen des Inhaltes der Pockenpusteln (*Virchow's Arch.*, CVI, 1886, p. 196). — Id., Bacteriologische Mittheilungen über Varicellen (*Berlin. klin. Wochenschr.*, 1886, p. 802).

(4) Marotta, Ricerche sul Microparassitica del vajuolo (*Rivista clinica e terapeutica*, VIII, nos 11 et 12, 1886).

(5) Hlava, Vysnam mikroorganisme pri variole (*Sbornik lekarsky*. Prag, 1887).

(6) Garré, Ueber Vaccine und Variola (*Deutsche med. Wochenschr.*, 1887, nos 12 et 13).

(7) Protopopoff, Zur Bacteriologie der Variola (*Zeitschr. für Heilkunde*, XI, 1890, p. 151).

mence directement dans le bouillon le pus qui en contient, recueilli aseptiquement. C'est certainement cette dernière espèce qu'a cultivée Protopopoff. Les cultures perdent du reste très vite également leur virulence et même leur vitalité.

Sanfelice et Malato (1) ont trouvé, dans le contenu des pustules, surtout le *Micrococcus pyogenes aureus*, le *Micrococcus pyogenes albus*, puis plus rarement le *Micrococcus pyogenes citreus*, le *Pneumocoque* et le *Colibacille*.

Plusieurs observateurs ont décrit dans la lymphe des pustules de variole des Protozoaires qu'ils donnent comme pouvant être l'agent de contage de la maladie. Pfeiffer (2) a vu chez l'homme et les mammifères des organismes mesurant 9 μ de long, qu'il rapproche des Coccidies. Loeff (3) signale, dans deux cas de variole confluente, des corps amœbiformes nombreux dans le sang. Guarnieri (4) trouve aussi de petites Amibes qu'il dénomme *Cytorycles variolæ*.

Salmon (5) et Huckel (6) croient que ces formes de Guarnieri ne sont que des altérations des cellules migratrices ayant pénétré dans les cellules épithéliales de la cornée du lapin, organe choisi pour bien suivre l'évolution de la lésion ; de semblables figures se rencontrent aussi, du reste, dans les cellules épidermiques soumises aux mêmes influences.

Catterina (7) arrive à la même conclusion pour les éléments similaires qu'il a rencontrés dans le liquide des pustules de varicelle.

Funck (8) regarde comme véritable agent de la variole le Protozoaire observé par Pfeiffer, auquel il applique le nom de *Sporidium vaccinale*, en admettant l'identité de la variole et de la vaccine. On le trouve dans le contenu des pustules qu'on fixe après dessiccation et qu'on colore à froid ou à chaud. Le mode d'examen le plus propice est la dilution du liquide de la pustule dans du bouillon ou de la solution physiologique, en proportion de 1 à 5, et l'étude à un grossissement de 400 à 500 diamètres. Il est encore préférable de faire l'examen après un séjour de quelques heures à 37°, en prenant les précautions voulues pour éviter l'évaporation du liquide, en usant d'une chambre humide, par exemple, et en faisant la préparation en goutte suspendue. On constate alors que le Sporozoaire se présente sous trois formes bien différentes : 1° des corps arrondis très réfringents, de 2 μ à 10 μ de diamètre, libres dans le liquide, présentant des mouvements lents ; 2° des petites sphères brillantes, de 1 μ à 3 μ de diamètre, renfermées par petits amas dans des

(1) Sanfelice et Malato, Studien über die Pocken (*Centralbl. für Bakt.*, XXV, 1898, p. 641).

(2) Pfeiffer, Ein neuer Parasit der Pockenprocess aus der Gattung Sporozoa. Weimar, 1887.

(3) Loeff, Ueber Proteiden oder Amoeben bei Variola vera (*Monatshefte für prakt. Derm.*, 1887, n° 10).

(4) Guarnieri, Ricerche sulla pathogenesi ed etiologia della infezione vaccinica e variolosa (*Archivio per le scienze mediche*, XVI, 1892).

(5) Salmon, Recherches sur l'infection dans la vaccine et la variole (*Ann. de l'Inst. Pasteur*, XI, 1897, p. 289).

(6) Huckel, Die vaccinekörperchen, nach Untersuchungen an der geimpfen Hornhaut des Kaninchen (*Ziegler's Beitr.*, 1898).

(7) Catterina, Contributo all'anatomia patologica ed all'eziologia della varicella (*Atti d. Soc. venetotrentina*, III, 1898).

(8) Funck, L'agent étiologique de la vaccine et de la variole (*Sem. méd.*, 20 févr. 1901). — Der Vaccine und Variolaerreger (*Centralbl. für Bakt.*, XXIX, 1901, p. 921).

cellules épidermiques; 3° des amas, arrondis, ovalaires ou piriformes, de 25 μ à 30 μ de longueur, formés par la réunion en forme de morula de corps ronds semblables aux premiers. Ces derniers éléments sont des kystes remplis de spores qui, mises en liberté, donnent les formes décrites en premier lieu. Les kystes s'isolent facilement. En émulsionnant dans un liquide stérile les spores qu'ils renferment, et en inoculant le tout, il est facile d'obtenir des pustules caractéristiques.

Ishigami (1) conclut aussi en faveur d'un Protozoaire bien semblable au précédent, qu'il cultive dans de la lymphe vaccinale récoltée aseptiquement. Ce parasite est très voisin du *Microsporidium bombycis* de la pébrine.

Roger et Weil (2) énoncent une opinion semblable. L'agent de la variole serait pour eux un Protozoaire de la famille des Sporozoaires. On le trouve abondamment dans le liquide des pustules varioliques et, très clairsemé, dans le sang des varioleux, sous forme de petits éléments arrondis ou ovalaires, de 1,75 μ en moyenne, se colorant d'une façon intense au bleu de Lœffler. En inoculant du pus variolique au lapin, on détermine une septicémie rapidement mortelle ; on retrouve de ces corpuscules dans le sang. On peut les cultiver dans du sang de lapin défibriné et déterminer, par l'inoculation de ces cultures au lapin, une affection identique à la première, obtenue avec le pus variolique. Il semble bien que ces éléments jouent ici un rôle de première importance.

En résumé, à part les formes de Protozoaires décrites dans la variole, comme dans la scarlatine, on isole surtout des Bactéries pyogènes. Elles semblent jouer un grand rôle dans la marche et la destinée de cette affection si contagieuse; mais ce rôle n'est pas précisé : il ne paraît jusqu'ici que secondaire. L'agent de contage reste encore à découvrir. C'est peut-être encore un de ces microbes invisibles ou filtrants (p. 16) (3).

Vaccine. — Quist (4) dit avoir cultivé du vaccin dans du sérum de sang de bœuf additionné de glycérine ; il se développait, au bout de huit à dix jours, une fine pellicule, formée de Microcoques. L'inoculation à l'enfant du produit de cette culture a donné une pustule vaccinale et conféré l'immunité pour le vaccin. Aucune observation n'a pu confirmer ces résultats.

Voigt (5) a isolé du vaccin trois espèces de *Micrococcus*. La première ne liquéfie pas la gélatine : ce sont des coccus souvent réunis par deux, donnant, en cultures sur plaques, des colonies grisâtres circulaires. En piqûre sur gélatine, elle forme une mince pellicule à la surface et un léger trouble dans le canal. L'inoculation d'une culture pure confère au veau l'immunité pour le cowpox. La seconde espèce, qui n'est pas constante, est formée de grands coccus, qui produisent une culture grenue, verdâtre, liquéfiant la gélatine. Enfin, il signale une dernière

(1) Ishigami, Ueber die Kultur des Vacciner resp. Variolaerregers (*Centralbl. für Bakt.*, XXXI, 1902, p. 794).

(2) Roger et Weil, Recherches microbiologiques sur la variole (*Soc. de Biol.*, 17 novembre 1900).

(3) Provazek et De Beaurepaire-Arago, Untersuchungen über die Variola (*Munch. med. Wochenschr.*, 3 nov. 1908).

(4) Quist, *Petersburger med. Wochenschr.*, 1883, n° 46.

(5) Voigt, *Deutsche med. Wochenschr.*, 24 décembre 1885.

espèce, qu'il a retrouvée dans la varicelle et qui paraît n'avoir aucune propriété pathogène, dont les cultures liquéfient aussi la gélatine.

Il est très probable que les expériences de Tenholt (1) sont aussi entachées de causes d'erreur. Il a reconnu, dans de la lymphe vaccinale, la présence d'une douzaine de *Micrococcus*, de deux Bacilles et de deux Levures. Pour le *vaccin*, on a aussi signalé des Sporozoaires. Pfeiffer, Loeff, Guarnieri ont trouvé des corps amœbiformes dans le liquide vaccinal; Guarnieri a aussi décrit un *Cytoryctes vaccinæ* identique au *Cytoryctes variolæ* dont il vient d'être parlé. Wasielewski (2) appuie tout à fait l'opinion de Guarnieri. Il est convaincu de la spécificité du Protozoaire décrit par ce dernier. Funck et Ishigami regardent aussi la vaccine comme causée par un Protozoaire identique à celui dont il a été parlé à propos de la variole et que le premier a dénommé *Sporidium vaccinæ*. Cet organisme peut aussi être isolé de la lymphe vaccinale et du vaccin conservé, dans les conditions citées ci-dessus; son inoculation, supposée pure, reproduit des pustules vaccinales typiques. Ses caractères morphologiques ont été donnés plus haut; depuis, Pfeiffer (3), parmi les nombreux organismes qu'il a rencontrés dans la lymphe de pustule vaccinale, signale en outre une Levure à cellules arrondies ou ellipsoïdes mesurant de 1,5 μ à 4,5 μ, qu'il nomme *Saccharomyces vaccinæ*, sans rien pouvoir préjuger de son action. Il a reconnu en outre les *Sarcina lutea* et *Sarcina aurantiaca*, communes dans l'air, et deux autres Sarcines dont les caractères sont très peu nets; un Bacille en courts bâtonnets, formant des colonies rappelant celles du *Proteus vulgaris* de Hauser; le *Micrococcus pyogenes aureus* et le *Micrococcus cereus albus*, de beaucoup le plus fréquent dans le liquide vaccinal.

Au point de vue des Bactéries, les recherches de Maljean (4) sont plus affirmatives. Elles en sont cependant encore à attendre confirmation. Dans les pustules vaccinales typiques et dans la pulpe vaccinale glycérinée, il dit rencontrer toujours, à côté d'espèces pyogènes ou saprophytes connues, un Microcoque donnant des cultures d'un blanc éclatant qu'il considère comme spécifique. Il l'a aussi retrouvé, presque constamment, dans le sang des papules de la *vaccine rouge*.

D'après lui, c'est un Microcoque un peu plus gros que le *Staphylocoque doré*. Les coccus sont isolés, en diplocoques ou en petits amas, rarement en courtes chaînes. Ils se colorent facilement aux couleurs d'aniline et *restent colorés* par la méthode de Gram.

Les cultures poussent facilement à 33°-38°, difficilement à 20°-22°, ce qui fait qu'il est difficile d'employer les plaques de gélatine pour isoler le microbe. C'est un anaérobie facultatif; mais il pousse mieux en présence d'air.

Sur *gélatine*, la culture est pénible et minime à cause de la basse température qu'il faut employer.

(1) Tenholt, Die Bacterien der Kälberlymphe (*Correspondenzbl. der allg. artzlichen Vereins von Thüringen*, 1887, n° 6).

(2) Wasielewski, Ueber die Form und Färbbarkeit der Zelleinschlüsse bei Vaccine Impfungen (Cytoryctes vaccinæ) (*Centralbl. für Bakt.*, XXI, 1897, p. 901). — Beiträge zur Kenntniss des Vaccineerregers (*Zeitschr. für Hygiene*, XXXVIII, 1901, p. 212).

(3) Pfeiffer, Die bisherigen Versuche zur Reinzüchtung der Vaccinecontagium (*Zeitschr. für Hygiene*, III, 2e p., p. 189).

(4) Maljean, Recherches sur les microbes du vaccin, et en particulier sur les coccus de la vaccine rouge (*Gaz. hebd.*, 1893, p. 282 et 283).

Dans le *bouillon*, le développement est rapide à 35°. Le liquide se trouble au bout de vingt-quatre heures et dépose des petites écailles blanches sur les parois du tube à la surface. En quelques jours, il s'est formé un voile incomplet, d'un blanc éclatant, qui tombe par lambeaux et se reproduit indéfiniment. Au fond se forme un dépôt blanc visqueux. Le bouillon garde pendant plus d'un mois une réaction franchement alcaline et finit par prendre une odeur spéciale assez fétide. Quand le liquide est additionné de lactose et de carbonate de chaux, il fermente rapidement et dégage une grande quantité de bulles de gaz.

Sur *gélose*, il se produit au bout de vingt-quatre heures des colonies arrondies, plates, d'un blanc éclatant.

Sur *sérum*, les colonies ressemblent aux précédentes.

Sur *pomme de terre*, la culture forme tantôt une mince bande d'un blanc de lait, tantôt un semis de petites saillies blanches, arrondies.

Le *lait* ne présente pendant les premiers jours aucun changement visible; au bout d'une semaine, il est coagulé et montre une réaction acide.

Toutes les cultures deviennent visqueuses et filantes. Elles conservent très longtemps leur activité.

En injection sous-cutanée, chez le lapin et la souris, les bouillons de culture déterminent la formation d'un petit nodule dur au point d'inoculation. Le centre du nodule contient une petite quantité d'une sorte de pus blanc, épais, dans lequel se retrouve le microbe en question. Souvent ce nodule s'indure, ne montre pas de tendance à s'ouvrir et se détache d'une seule pièce comme une escarre.

En inoculant des génisses avec des cultures pures, suivant les procédés usités pour le vaccin, Maljean a obtenu, après deux passages, de belles pustules dont le contenu a pu être récolté pour servir à des expériences sur l'homme. Le contenu de ces pustules ne renfermait que le Microcoque inoculé.

La pulpe vaccinale ainsi préparée, employée chez un assez grand nombre d'hommes adultes, a donné une forte proportion (jusqu'à 75 p. 100) de succès ; elle a produit des éruptions vaccinales typiques.

Nakanishi (1) a décrit, sous le nom de *Bacillus variabilis lymphæ vaccinalis*, un Bacille qu'il a isolé du vaccin animal et du vaccin humain. Ses caractères morphologiques, la présence de nombreux éléments en massue et de formes ramifiées surtout, le rapprochent du *Bacille pseudo-diphtérique*, auquel il doit probablement être identifié ; il n'aurait rien de spécifique ici. D'après Ficker (2), du reste, on le rencontrerait très souvent sur la peau normale, chez le veau.

Sabrazès et Joly (3) ont isolé du vaccin de génisse un *Streptothrix* qui leur paraît spécial, mais qui n'a rien de spécifique. C'est peut-être le même organisme que le *Leptothrix* signalé par Klein.

Les recherches de nombreux autres observateurs (4) ont également

(1) Nakanishi, Bacillus variabilis lymphæ vaccinalis, ein neuer, konstant in Vaccinepusteln vorkommender Bacillus (*Centralbl. für Bakt.*, XXVII, 1900, p. 641).

(2) Ficker, Ueber den von Nakanishi aus Vaccinepusteln gezüchteten neuer Bacillus (*Ibid.*, XXVIII, p. 529).

(3) Sabrazès et Joly, Sur un nouveau *Streptothrix* fréquemment isolé du vaccin de génisse (*Soc. de Biol.*, 29 janvier 1898).

(4) Pfeiffer, Die neueren seit 1887 vorgenommenen Versuche zur Reizüchtung des Vaccinecontagium (*Zeitschr. für Hygiene*, XXXIII, p. 306). — Saquépée, Étude sur la flore bactérienne du vaccin. Thèse de Lyon, 1896. — Lemoine, Contribution à l'étude

permis de constater dans le vaccin la présence de plusieurs formes microbiennes, Microcoques ou Bacilles. Elles n'ont pu, toutefois, arriver à faire reconnaître parmi elles un microbe réellement spécifique. Mais, en plus, elles tendent à faire penser que les microbes constatés paraissent être tous de purs saprophytes; quelques similitudes de caractères ont pu faire croire à la présence de microbes pyogènes cités précédemment; la lymphe vaccinale pure, non virulente, n'en renfermerait jamais. En outre, l'addition de glycérine, que l'on pratique d'ordinaire, amène une disparition graduelle des microbes existants, tout en respectant la virulence spéciale; de telle sorte qu'au bout de quatre mois un tel vaccin, bien que très actif, se montre totalement dépourvu des microbes constatés au début.

Ces expériences demandent toutefois à être reprises et étendues. On comprend, en effet, la grande utilité qu'il y aurait à vacciner avec les cultures pures; outre la facilité plus grande d'obtenir du vaccin, on écarterait du coup toute chance d'infection étrangère.

Des recherches nouvelles (1) tendent à faire admettre, comme pour la variole, que le microbe de la vaccine est un microbe filtrant, de trop petites dimensions pour pouvoir être distingué avec les procédés ordinaires.

MICROCOCCUS DANS LA ROUGEOLE.

Coze et Feltz, dans leur ouvrage précité, signalent, dans le sang d'enfants malades de la rougeole, la présence de petites Bactéries très mobiles. Ces *points mobiles* s'observent surtout, d'après eux, dans le sang pris en un point du corps où l'éruption existe; ils sont bien moins nombreux dans le sang recueilli aux parties indemnes.

Cornil et Babès ont trouvé dans le sang des *Micrococcus* ronds de 0,6 µ de diamètre, réunis souvent en diplocoques ou en petits chapelets; ils en ont rencontré d'identiques dans les sécrétions nasale et conjonctivale. Les mêmes Bactéries existaient dans les crachats d'enfants atteints de pneumonie rubéolique. Dans les poumons de sujets morts de cette complication si fréquente, le contenu alvéolaire renferme des quantités de diplocoques.

Du sang recueilli au niveau des taches de l'exanthème donne, sur sérum, d'après ces auteurs, une culture mince, superficielle, ressemblant à celle du *Micrococcus pyogenes*. Cette culture est formée de coccus en chaînettes. Une inoculation d'une parcelle de cette culture sous la peau

bactériologique de la pulpe vaccinale glycérinée (*Revue d'hyg.*, 1897, p. 732). — Kent, The virus of vaccinia and its cultivation (*Lancet*, 21 mai 1898). — Kirchner, Ueber den Keimgehalt animaler Lymphe (*Zeitschr. für Hygiene*, XXIV, 1897, p. 530). — Deeleman, Ueber den Bakteriengehalt der Schutzpockenlymphe (*Arb. aus dem kaiserl. Gesundheitsamte*, XIV, 1898, p. 88). — Migula, Der Keimgehalt und die Widerstandfähigkeit der Bakterien der animalen Lymphe (*Arb. aus dem bakt. Inst. d. techn. Hochschule zu Karlsruhe*, II, 1898, p. 65). — Panzelow et Czaplewski, Beiträge zur Lehre von der Staphylokokken der Lymphe (*Centralbl. für Bakt.*, XXV, 1899, p. 141).

(1) Paschen, Was wissen wir über den Vaccinerreger (*Münch. med. Wochenschr.* 1906, p. 291). — Negri, Ueber Filtration des Vaccinevirus (*Zeitschr. für Hyg.*, LIV, 1906, p. 327). — Remlinger et Osman Nouri, Sur le passage du virus vaccinal à travers la bougie Berkefeld (*Soc. de Biol.*, 27 mai 1905). — Volpino, Ulteriori ricerche sui corpus coli mobili del vaccine (*Riv. di Igiene*, XIX, 1908).

du nez d'un cobaye a produit des rougeurs diffuses, de la fièvre et une légère conjonctivite.

Canon et Pielicke (1) ont observé dans le sang des rubéoleux, pendant toute la durée de la maladie et même après la défervescence, un fin Bacille, se colorant difficilement avec la solution de Lœffler, se décolorant par la méthode de Gram. Il pousse très peu dans le bouillon peptonisé ensemencé directement avec le sang, et pas du tout sur les autres milieux. Les inoculations aux animaux ne leur ont rien donné. Ils l'ont retrouvé en abondance dans l'expectoration, dans les sécrétions nasale et conjonctivale des mêmes malades.

Doehle (2) et Pfeiffer (3) ont aussi signalé dans le sang des malades la présence de Protozoaires, simples corps amœbiformes ou corps munis de prolongements filiformes, dont la signification est toujours problématique.

Ce sont là les seules données sérieuses que l'on possède sur cette affection, une des plus contagieuses assurément (4). Ici aussi, les microbes pyogènes semblent jouer un rôle important, surtout dans les complications si ordinaires de l'affection, la bronchopneumonie rubéolique en particulier.

MICROCOCCUS DANS LES OREILLONS.

Charrin et Capitan ont signalé, dès 1881, la présence de Microcoques dans le sang de malades atteints d'oreillons.

Laveran et Catrin (5) ont isolé, du sang ou du liquide de ponction de la parotide ou du testicule atteint d'orchite ourlienne, des diplocoques à éléments arrondis, mesurant de 1 μ à 1,5 μ de diamètre, bien mobiles, se colorant facilement aux couleurs d'aniline et se *décolorant* par la méthode de Gram.

Ils en ont obtenu facilement des cultures sur les milieux habituels.

Le *bouillon* se trouble en vingt-quatre heures à 35° et, au bout de quelques jours, il se forme un dépôt minime sur les parois et surtout au fond du vase.

Sur *plaques de gélatine*, on distingue, au bout de quarante-huit heures, de petites colonies punctiformes blanches qui se développent lentement et ne liquéfient que tardivement.

Sur *gélatine*, en *piqûre*, tout le long de la piqûre il se développe de petits points blancs qui confluent bientôt ; à la surface, il se forme un petit disque blanc. Au bout de quelques jours, la gélatine se creuse à la partie supérieure et se liquéfie très lentement.

Sur *gélose* à 35°, il se forme une bande blanche le long de la strie.

Sur *pomme de terre*, la culture est blanchâtre, peu apparente.

Les inoculations aux animaux n'ont donné aucun résultat.

(1) Canon et Pielicke, Ueber einen Bacillus im Blute vom Masernkranken (*Berlin. klin. Wochenschr.*, XXXIX, 1892, p. 577).

(2) Doehle, Vorläufige Mitheilung über Blutbefunde bei Masern (*Centralbl. für allg. Path.*, 1892, n° 4). Et : Zur Aetiologie von Masern, Pocken, Scarlach, Syphilis (*Centralbl. für Bakt.*, XII, 1892, p. 906).

(3) Pfeiffer, Die Zellerkrankungen durch Sporozoen. Iéna, 1893.

(4) Nissen, Der Masernbacillus (*Arch. für Derm.*, LX, 1902).

(5) Laveran et Catrin, Sur un diplocoque trouvé chez des malades atteints d'oreillons (*Soc. de Biol.*, 28 janvier 1893).

Laveran et Catrin ont rencontré ce Microcoque soixante-sept fois sur quatre-vingt-douze cas, dans le sang ou la sérosité de la parotide ou du testicule malade, deux fois dans l'arthrite ourlienne.

Busquet et Boudeaud (1) disent avoir isolé des oreillons du chien un microbe analogue ou identique au précédent, se trouvant dans la salive sous forme de diplostreptocoque et dans le sang sous forme de diplocoque.

Letzerich (2) a isolé du sang et de l'urine de sujets atteints d'oreillons un Bacille court et large, ne se colorant bien qu'aux deux pôles, donnant une culture sèche et mate sur pomme de terre. Il le considère comme l'agent spécifique de l'affection.

Pour Granata (3), l'agent spécifique des oreillons serait un microbe filtrant qui se trouve en abondance dans la salive.

MICROCOCCUS DANS LE SCORBUT.

Afanasieff (4) signale dans le pus d'abcès sous-cutanés un coccus encapsulé qui se décolore au Gram et croît facilement sur les milieux habituels.

Il ne liquéfie pas la gélatine; il rend le bouillon très visqueux, à tel point qu'on peut presque retourner le tube sans que le liquide s'écoule; il coagule faiblement le lait et produit des gaz aux dépens du glucose.

Il n'est pathogène pour le lapin qu'en injections massives; on observe alors parfois la production de suffusions sanguines dans le tissu conjonctif sous-cutané et les organes internes.

Lewine (5) a obtenu du sang, dans onze cas, un Bacille court, à bouts arrondis, qu'il rapproche du *Bacille de la septicémie hémorragique* de Hueppe; il le nomme *Bacillus hæmosepticus*. Ce serait pour lui une variété spéciale, distincte du *Bacille du choléra des poules*, adaptée à l'organisme humain. Comme ce dernier, il est très pathogène pour les oiseaux et le lapin et occasionne les mêmes symptômes.

MICROCOCCUS DANS LA RAGE.

Pasteur et Gibier (6) ont cru reconnaître des *Micrococcus* mobiles dans la substance cérébrale d'animaux morts de la rage.

Hermann Fol (7) a décrit, dans des moelles rabiques colorées à l'hématoxyline par la méthode de Weigert, des Microcoques de 0,2 μ, souvent associés par deux, logés dans les lacunes de la névroglie ou entre les cylindraxes et leur gaine. La moelle ensemencée dans du bouillon a produit un très léger trouble, qui se dépose au quatrième jour. Le dépôt, inoculé à des animaux sains, leur aurait transmis, dans

(1) Busquet et Boudeaud, Les oreillons du chien (*Presse médicale*, 28 sept. 1901).
(2) Letzerich, *Allg. med. Centr. Zeit.*, 21 August 1895.
(3) Granata, Sulla etiologia degli orecchioni da virus filtrabile. Cagliari, 1908.
(4) Afanasieff, Recherches bactériologiques sur le scorbut (*Wratsch*, 1896, p. 133).
(5) Lewine, Recherches sur l'étiologie du scorbut (*Arch. des sc. biol. de Saint-Pétersbourg*, VIII, 1901, p. 275).
(6) Gibier, Thèse de Paris, 26 juillet 1884, et *C. R. de l'Acad. des sc.*, XCVI, 1883.
(7) H. Fol, Sur le microbe dont la présence paraît liée à la virulence rabique (*C. R. de l'Acad. des sc.*, 14 décembre 1885).

quelques cas seulement, une véritable rage, mais à incubation très longue.

Babès (1) a réussi à cultiver un *Micrococcus* de 0,4 μ à 0,6 μ qui se développe lentement à 37° et forme sur gélatine et sur gélose de petites taches grisâtres le long de la strie d'inoculation. Les coccus, souvent unis par deux, sont difficiles à colorer. Des cultures pures de deuxième et troisième génération, inoculées aux animaux, leur donnent la rage. A côté de ces *Micrococcus*, il a rencontré des *Bacilles* légèrement courbes, mesurant 2 μ à 3 μ de long, sur 0,6 μ de large.

Mottet et Protopopoff (2) ont isolé du cerveau et de la moelle rabique une Bactérie en très fins bâtonnets, qu'ils regardent comme spécifique.

On la rencontre abondamment dans la sérosité trouble des ventricules du cerveau des chiens porteurs de la rage des rues et des chiens inoculés. Elle se cultive dans le bouillon de viande vers 35°, qui se trouble déjà à la fin du deuxième jour. Le liquide est régulièrement trouble, sans flocons ; il y reste deux ou trois semaines, puis il se forme un léger dépôt et il s'éclaircit. Les cultures sur gélatine et sur gélose ne réussissent pas. Les lapins inoculés par trépanation avec de ces cultures meurent en douze heures avec les symptômes de la rage paralytique ; leur moelle transmet une rage identique à des lapins sains. L'inoculation sous la peau occasionne la mort, de deux à six jours, avec les mêmes symptômes que la trépanation. Des chiens inoculés par trépanation avec la moelle de ces lapins meurent en six ou sept jours de rage paralytique. Ces résultats n'ont pas été confirmés.

Memmo (3) a isolé des centres nerveux de chiens morts de rage une Levure qu'il a obtenue en cultures pures. L'inoculation intracranienne ou intra-oculaire de ces cultures déterminerait chez le chien, après une incubation de trente à soixante jours, une affection qui lui paraît être la rage, surtout la forme paralytique.

Cependant, les expériences de Nocard (1880) et P. Bert (1882) démontrent qu'en filtrant sur plâtre de la salive de chien rabique le liquide qui passe est dépourvu de virulence et que celle-ci se retrouve entière dans ce qui reste sur le filtre. Elle serait donc bien due à des éléments solides en suspension.

L'agent contagieux n'est cependant pas répandu dans tout l'organisme, même à la période ultime.

On sait depuis longtemps que la salive est virulente. C'est par son intermédiaire que se fait d'ordinaire la contagion. Elle l'est même très tôt ; les recherches de Nocard et Roux (4) établissent que, chez le chien, elle peut déjà l'être trois jours avant l'apparition de tout changement dans les allures de l'animal.

Le cerveau et la moelle sont toujours virulents lorsque les animaux présentent des symptômes paralytiques ; si les animaux périssent très

(1) Babès, *in* Cornil et Babès, Les Bactéries, 3e éd., t. II, p. 526, et Notes sur la rage expérimentale (*Journ. des conn. méd.*, 1887, p. 162).

(2) Mottet et Protopopoff, Ueber einen Mikroben, der bei Kaninchen und Hunden eine der paralytischen Tollwuth ganzähnlich Krankheit hervorruft (*Centralbl. für Bakt.*, II, 1887, p. 585).

(3) Memmo, Beiträge zur Aetiologie des Rabies (*Centralbl. für Bakt.*, XX, 1896, p. 209).

(4) Nocard et Roux, A quel moment le virus rabique apparaît-il dans la bave des animaux enragés? (*Ann. de l'Inst. Pasteur*, IV, 1890, p. 163).

tôt, cette virulence peut faire défaut. Le bulbe est toujours virulent, le liquide encéphalo-rachidien aussi. Dans les nerfs, la virulence est plus irrégulière et se rencontre surtout dans les portions voisines des centres.

Le sang n'est jamais virulent ; la lymphe de même.

Le muscle, le foie, la rate, l'urine, le sperme, l'humeur aqueuse ne sont jamais virulents.

Les glandes lacrymales, le pancréas renferment quelquefois le contage.

Le lait est très souvent virulent.

La plupart des animaux sauvages ou domestiques sont réceptifs ; les oiseaux sont à peu près réfractaires.

En résumé, on ne connaît encore rien de certain sur cette question où interviennent peut-être aussi les microbes filtrants (1).

ESPÈCES CHROMOGÈNES.

MICCROCOCCUS PRODIGIOSUS Ehrenberg.

Cette dénomination ne se trouve placée ici que pour mémoire. L'espèce *Micrococcus prodigiosus* ne se sépare que bien difficilement de certains types à courts bâtonnets rentrant dans le genre *Bacillus* ; d'un autre côté, on doit reconnaître la tendance qu'elle présente à donner des éléments allongés dans certaines conditions ; de là vient qu'on la décrit souvent sous le nom de *Bacillus prodigiosus*. Il y a certainement avantage à réunir l'étude de toutes ces formes bien voisines. C'est la raison pour laquelle l'étude de ce type sera faite dans le genre *Bacillus* sous la dénomination précitée de *Bacillus prodigiosus*.

MICROCOCCUS FULVUS Cohn.

C'est une espèce dont les caractères ne sont pas encore suffisamment précisés. Elle a été observée par Cohn (2) sur les excréments de cheval et de lapin, à la surface desquels elle formait de petites gouttes muqueuses, bombées, de coloration rougeâtre, parfois légèrement rosée. Ces gouttelettes s'étendent, en vieillissant, à la surface du milieu nutritif, et arrivent à former une couche muqueuse continue.

Les cellules immobiles sont presque régulièrement sphériques, atteignant 1,5 µ de diamètre, et posséderaient, d'après Cohn, un noyau réfringent.

La matière colorante est insoluble dans l'eau ; elle ne change ni par les acides ni par les alcalis.

Il ne liquéfierait pas la gélatine.

A en rapprocher probablement *Micrococcus brunneus*.

Le *Micrococcus fuscus*, d'Eisenberg (Coccus brunde Maschek), liquéfie la gélatine : le liquide se teint en brun et montre à la surface un voile brun-sépia. La culture sur pomme de terre est brune, visqueuse, devenant presque noire en quelques jours.

(1) Bertarelli et Volpino, Experimentalle Untersuchungen über die Wuth (*Centralbl. für Bakt.*, 1 Abth., Orig., XXXVII, 1904, p. 51).

(2) Cohn, Untersuchungen über Bacterien. II (*Beitr. zür Biol. der Pflanzen*, 1er vol., 3e p., 1875).

MICROCOCCUS ROSEUS Flugge.

Il est très commun dans l'air et s'observe fréquemment comme impureté, à la surface des cultures sur plaques.

Ce sont de gros coccus réunis par deux ou en tétrades, quelquefois en petites chaînes de trois éléments ; ils sont habituellement asymétriques, les faces d'union des éléments d'un couple sont nettement aplaties. Ils mesurent en moyenne 1,4 μ de plus grand diamètre.

Ce *Micrococcus* forme à la surface des plaques de gélatine de petits boutons rosés, souvent mamelonnés au centre. Les colonies s'élargissent lentement et atteignent 1 à 3 millimètres de large après quelques jours. Le mamelon central peut croître en même temps et donner un petit prolongement digitiforme droit ou courbé. La gélatine *n'est pas liquéfiée*.

Inoculé en strie sur gélatine ou gélose, il donne, au bout de peu de temps, une bande plus large à sa partie inférieure, d'une belle teinte rosée, à bords transparents blanchâtres, laissant souvent voir des stries concentriques plus claires. La surface est lisse, comme vernissée. La gélatine est légèrement ramollie dans ses couches superficielles et souvent très lentement liquéfiée. Le liquide est teinté de rouge, mais est beaucoup plus vermillon qu'avec le *Micrococcus prodigiosus*. La culture développe une faible odeur fécaloïde.

Il existe certainement plusieurs espèces, à caractères bien voisins.

Le *Micrococcus rouge-cerise* de List s'en rapproche. C'est une Bactérie isolée de l'eau. Les éléments sphériques sont très petits, de 0,25 μ à 0,32 μ de diamètre ; ils sont unis en diplocoques ou en longues chaînettes. Sur gélose et sur pomme de terre, la culture donne un large revêtement rouge-cerise et ne développe aucune odeur. La matière colorante est insoluble dans l'eau, l'alcool et l'éther et ne se modifie pas sous l'influence des acides ou des alcalis.

Très voisin également est le *Micrococcus carneus* de Zimmermann, qu'on doit très probablement identifier au *Coccus rouge* (*Rother coccus*) de Maschek, espèce commune de l'eau. Ce sont des coccus immobiles, de 0,83 μ de diamètre, réunis en petits amas ou en tétrades, restant colorés par la méthode de Gram. En culture *sur plaques*, les colonies qui arrivent à la surface de la gélatine sont rougeâtres, discoïdes ; le centre, plus sombre, est entouré d'une zone annulaire plus claire. La *gélatine* n'est pas liquéfiée. Sur *gélose*, on obtient une culture rouge rosé ou rouge-chair. La culture sur gélatine reste plus mince ; celle sur *pomme de terre* est abondante.

On a décrit de nombreuses autres espèces de Microcoques produisant du pigment rose. Parmi celles qui ne liquéfient pas la gélatine, on doit placer les suivantes : *Micrococcus cerasinus*, isolé d'un lait rouge par Keferstein (1) ; *Micrococcus lactericeus*, trouvé par Freund (2) dans la bouche ; *Micrococcus coccineus*, trouvé par Adametz (3) dans le fromage

(1) Keferstein, Ein neuer farbstoffbildender Micrococcus aus rother Milch (*Centralbl. für Bakt.*, XXI, 1897, p. 177).

(2) Freund, Ein Beitrag zur Kenntniss chromogener Spaltpilze und ihrer Vorkommen in der Mundöhle. Thèse d'Erlangen, 1893.

(3) Adametz, Bakteriologische Untersuchungen über den Reifungsprozess der Käse (*Landwirts. Jahrb.*, XVIII, 1889, p. 242).

(*M. n° VI*); *Micrococcus bicolor*, isolé par Kern (1) du contenu du tube digestif des oiseaux.

D'autres espèces à pigment rose liquéfient la gélatine : parmi elles se rencontrent : *Micrococcus persicus*, *Micrococcus cumulatus*, *Micrococcus subcarneus*, *Micrococcus rubiginosus*, isolés par Kern dans les mêmes conditions que le précédent ; *Micrococcus rosaceus*, *Micrococcus carnicolor*, isolés de l'air par Frankland (2).

MICROCOCCUS CINNABAREUS Flugge.

C'est encore une Bactérie de l'air, contaminant fréquemment les cultures, se rencontrant probablement aussi dans l'eau.

D'après Flügge, les éléments sont gros ; d'après mes cultures, ces coccus mesurent 0,9 μ de largeur ; ils sont d'habitude réunis en diplocoques, parfois en tétrades, ou en petits amas. Leur forme est ovoïde, irrégulière ; un des côtés, celui qui touche à l'autre élément du couple, est aplati.

Les colonies sur plaques sont peu caractéristiques. Ce sont de petits boutons d'un rouge terne. Elles ne liquéfient pas la gélatine.

Inoculé en piqûre, dans un tube de gélatine, il ne se développe bien qu'aux endroits en contact avec l'air ; il forme à la surface un bouton aplati, d'un rouge-brique un peu rosé, qui se continue dans la gelée par une courte tige de même nuance ; dans le reste du trajet de la piqûre, on n'observe qu'un développement peu apparent de petites colonies teintées en jaune rouge, arrondies. J'ai observé la liquéfaction de la gelée, mais après un temps parfois très long : le liquide est trouble et laisse déposer un sédiment rouge ocracé.

En strie sur gélatine et surtout sur gélose, il donne une large colonie en forme de spatule, d'abord d'un rouge-brique un peu jaunâtre, puis teintée de rose tendre, à bords sinueux et à surface verruqueuse. La substance de la colonie est molle, peu cohérente, se séparant facilement et se dissociant très vite dans un liquide.

Il produit dans le bouillon un trouble persistant et un dépôt rouge-brique, très cohérent et visqueux ; le liquide garde une certaine viscosité.

Les cultures développent une odeur fade, douceâtre ; les vieilles sont toutes très visqueuses.

Le *Micrococcus cinnabarinus* de Zimmermann, isolé de l'eau, ne peut pas en être distingué ; également peut-être le *Micrococcus corallinus* de Catani (3). Ce dernier, toutefois, liquéfierait la gélatine après vingt ou vingt-cinq jours.

MICROCOCCUS AGILIS Ali Cohen.

Ali-Cohen (4) a décrit sous le nom de *Micrococcus agilis* un coccus à

(1) Kern, Beitrag zur Kenntniss der im Darme und Magen der Vögel vorkommenden Bakterien (*Arb. aus der Bakt. Inst. der techn. Hochschule zu Karlsruhe*, I, 1897, p. 485).

(2) G. et P. Frankland, Studies on some new micro-organisms obtained from air (*Philosoph. Transact. of the R. Soc. of London*, vol. CLXXVIII, 1887).

(3) Catani, Ueber einen neuen chromogenen Micrococcus (*Centralbl. für Bakt.*, XXXII, 1898, p. 308).

(4) Ali-Cohen. Eigenbewegung bei Mikrokokken (*Centralbl. für Bakt.*, VI, 1889, p. 33).

éléments de 1 μ de diamètre moyen, isolés, en diplocoques ou en tétrades. Migula aurait rencontré dans une culture des paquets typiques de Sarcines, comprenant huit et jusqu'à soixante-quatre éléments; aussi dénomme-t-il l'espèce *Plano-sarcina agilis*.

Le caractère particulier de cette espèce est sa motilité. La vraie motilité est plutôt rare chez les *Micrococcus*. Elle est ici généralement peu prononcée; cependant, dans ses cultures en milieux liquides, après des séries de repiquages successifs, elle peut être assez vive. Une partie seulement des éléments montre des cils, après coloration aux méthodes appropriées; il en existe le plus souvent un seul, quelquefois deux, d'assez grande longueur, pouvant mesurer dix fois le diamètre de l'élément.

Le microbe se colore légèrement aux méthodes habituelles, et *reste coloré* par la méthode de Gram.

Les cultures s'obtiennent facilement, paraissent réussir au mieux vers 15°-20°, exclusivement en présence d'air. Elles sont généralement colorées en rose sombre, pouvant virer au rouge-cinabre.

Sur *plaques de gélatine*, le microbe donne de petites colonies punctiformes, d'abord grisâtres, puis prenant après cinq jours une teinte rosée. Elles n'atteignent guère quelque taille. Celles de la surface s'étalent un peu plus que celles de la profondeur et deviennent nettement roses. La gélatine *n'est pas liquéfiée*.

Sur *gélatine en piqûre*, on obtient dans le canal une mince culture blanchâtre et à la surface un disque assez épais rose foncé. La gelée *n'est pas liquéfiée*.

Sur *gélose*, la culture est assez épaisse, d'un rose sombre.

Sur *pomme de terre*, il se développe très lentement de petites colonies punctiformes, qui, après long temps, peuvent confluer en un revêtement continu rosé.

Dans le *bouillon*, on a un léger trouble et un minime sédiment rosé; souvent, à la surface, un anneau rosé contre la paroi.

Ce microbe a été trouvé dans l'eau, où il ne paraît pas commun.

On a signalé quelques autres *Micrococcus* mobiles, distincts de celui-ci. Menge (1) a isolé un *Micrococcus agilis citreus* d'une infusion végétale. Il se cultive facilement en donnant des cultures jaunes et ne liquéfie pas la gélatine. Catterina (2) a décrit sous le nom de *Micrococcus agilis albus* une espèce mobile, isolée du sang de lapins morts d'une septicémie spéciale. Les éléments sont isolés ou en diplocoques, bien mobiles, munis le plus souvent de deux cils diamétralement opposés lorsqu'ils sont isolés et d'un seul cil au pôle libre lorsqu'ils sont en diplocoques. Les éléments se colorent bien aux méthodes ordinaires et *restent colorés* par la méthode de Gram. Ils se cultivent facilement en anaérobie ou aérobie. Les cultures sont blanchâtres. Les cultures en piqûre sur gélatine montrent, le long du canal, de fins prolongements radiaires, un peu comme les jeunes cultures de *Bacille du charbon*. La gélatine n'est pas liquéfiée. On ne constate jamais d'indol dans les cultures. L'espèce paraît pathogène, quoique irrégulièrement, pour le lapin, le cobaye et la souris blanche; elle tue avec des lésions ordinaires de septicémie.

(1) Menge, Ueber einen Micrococcus mit Eigenbewegung. M. agilis citreus (*Centralbl. für Bakt.*, XII, 1892, p. 49).

(2) Catterina, Ueber eine bewimperte Micrococcusform (*Ibid.*, Orig., XXXIV, 1903, p. 108).

MICROCOCCUS RUBESCENS Lembke.

Lembke (1) le signale dans le contenu intestinal.

Ce sont des diplocoques qui *restent colorés* par la méthode de Gram.

Sur *plaques de gélatine*, il donne en quarante-huit heures de petites colonies punctiformes, qui au microscope paraissent grisâtres et granuleuses. Après quatre jours, les colonies sont grosses comme des têtes d'épingles, d'un gris rosé un peu jaunâtre ; les profondes, plus claires, sont finement striées; les superficielles, minces, fortement striées, à bords nets, ont un éclat rougeâtre. Plus tard, ces dernières deviennent d'un rose rouge foncé et proéminent un peu sur la gélatine. La liquéfaction ne se produit pas.

Sur *gélatine*, en piqûre, après une huitaine de jours, on a à la surface un petit bouton rouge, et dans la piqûre un trait rosé à la partie supérieure, blanc au-dessous. La gélatine n'est pas liquéfiée.

Sur *gélose*, la culture est assez épaisse, lisse, d'un rose rouge.

Sur *pomme de terre*, la culture est rouge foncé.

Dans le *bouillon*, il se fait un trouble régulier et se dépose un sédiment visqueux.

Le microbe ne fait pas fermenter les sucres et ne produit pas d'indol.

MICROCOCCUS SUBLILACINUS Lembke.

Lembke (1) le signale dans le contenu intestinal.

Ce sont des diplocoques qui *restent colorés* par la méthode de Gram.

Sur *plaques de gélatine*, il donne en quarante-huit heures de petites colonies lenticulaires, d'un jaune brunâtre, à centre plus sombre et à rebord foncé, au miscrocope. Chaque colonie s'enfonce bientôt dans un entonnoir de liquéfaction. La liquéfaction est rapide.

Sur *gélatine*, en piqûre, il se forme rapidement à la surface une dépression cupuliforme et dans le canal un ruban blanchâtre. La cupule grandit vite, la gélatine se liquéfie et montre à la surface un voile d'un blanc de lait. La liquéfaction progresse rapidement ; le liquide est trouble avec sédiment blanc jaunâtre.

Sur *gélose*, il se forme une culture blanche, lisse ou granuleuse, qui plus tard prend une nuance lilas.

Sur *pomme de terre*, la culture est assez épaisse, sèche, de couleur blanc-lilas, ou lilas rosé.

Dans le *bouillon*, il se fait un trouble avec des filaments muqueux.

Les sucres sont légèrement attaqués avec production d'une légère réaction acide.

Il ne se produit pas d'indol.

MICROCOCCUS AURANTIACUS Schroeter.

Il forme sur tous les milieux nutritifs solides des taches circulaires, peu proéminentes, colorées en jaune orangé. C'est une des espèces les plus communes de l'air; elle s'observe journellement sur les plaques. Elle se rencontre fréquemment dans l'eau.

(1) Lembke, Beiträge zur Bakterienflora des Darmes (*Arch. für Hyg.*, XXVI, 1896, p. 312, et XXIX, 1897, p. 328).

Les cellules sont elliptiques, de 1,5 μ de grand diamètre, légèrement mobiles, isolées ou réunies par deux ou quatre ; le plus souvent elles forment de gros diplocoques à éléments asymétriques. Sur les milieux solides, il forme une couche jaune assez épaisse et sur le bouillon une mince pellicule de même nuance. Sur pomme de terre, il donne de petites calottes sphériques, d'un orange sombre. La matière colorante, d'après Schroeter (1), est incomplètement soluble dans l'eau, l'alcool et l'éther.

Les colonies en cultures sur plaques sont jaune-orange, rondes ou elliptiques, à bords nets, à surface lisse et brillante, finement ponctuées au microscope. Elles ne liquéfient pas la gélatine.

MICROCOCCUS LUTEUS Schroeter.

On le trouve fréquemment sur les milieux nutritifs solides exposés à l'air. Il forme, sur les tranches de pommes de terre, de petites masses muqueuses d'un jaune-citron, qui se dessèchent un peu en donnant un petit dôme. Il ne liquéfie pas la gélatine et forme à la surface du bouillon une membrane épaisse qui se plisse au bout de peu de temps.

Les coccus sont elliptiques, très réfringents et mesurent en moyenne 1 μ.

La matière colorante est insoluble dans l'eau ; les acides et les alcalis sont sans action sur elle.

Adametz (2) a décrit sous le nom de *Diplococcus luteus* une espèce différente de celle de Schroeter.

Ce sont des coccus longs de 1,2 μ à 1,3 μ réunis par deux, très mobiles ; dans les liquides, ils forment des voiles constitués par des chaînettes d'une dizaine d'éléments, montrant des mouvements de reptation.

Les colonies, en cultures sur plaques, sont arrondies, jaunes, d'une consistance filante. Ces colonies, vues à un faible grossissement, sont granuleuses et ont le centre jaune brunâtre. Elles atteignent facilement 3 millimètres de diamètre et liquéfient lentement le milieu.

En piqûre dans la gélatine, le développement est rapide, mais ne se fait qu'à la surface. On obtient un disque jaune-citron, de consistance muqueuse ; la gelée qui se trouve au-dessous se colore fortement en brun rouge. La liquéfaction se fait lentement, après plusieurs semaines.

Sur gélose, la culture est jaune, filante, et colore aussi la gelée en brun.

La culture sur pomme de terre est d'un jaune sale, devenant brunâtre avec l'âge, et dégage une odeur de moisi.

Cette espèce précipite la caséine du lait.

C'est une espèce voisine que Zimmermann (3) a isolée de l'eau de Chemnitz et nommée *Micrococcus sulphureus*. Cependant, la culture sur pomme de terre est un peu différente ; elle ne forme que de petits îlots minces, jaunes, et la gélatine ne paraît pas être liquéfiée.

Il faut aussi en rapprocher le *Micrococcus agilis citreus* de Menge (4).

(1) Schroeter, Ueber einige durch Bacterien gebildete Pigmenten (*Beitr. zur Biol. der Pflanzen*, I, 2e p.).

(2) Adametz, Die Bacterien der Trink-und Nutzwässer. Wien, 1888.

(3) Zimmermann, Die Bacterien unserer Trink-und Nutzwässer. Chemnitz, 1890.

(4) Menge, Ueber einen Micrococcus mit Eigenbewegung, Micrococcus agilis citreus (*Centralbl. für Bakt.*, XII, 1892, p. 49).

On rencontre, du reste, dans les divers milieux, l'eau, l'air, la terre, les excréments, etc., de nombreux Microcoques donnant des colonies d'un jaune-citron, qui paraissent différer par certains caractères. Les uns ne liquéfient pas la gélatine, d'autres la liquéfient. Leur distinction est encore incomplète.

MICROCOCCUS FLAVUS LIQUEFACIENS Flugge.

Il est commun dans l'air et l'eau.

C'est un ferment actif des divers sucres.

Les coccus sont gros, immobiles, réunis par deux ou en plus grand nombre.

Sur plaques de gélatine, il forme des colonies jaunâtres s'enfonçant dans la gélatine. La gélatine se liquéfie bientôt tout autour d'elles et la masse prend une teinte franchement jaune. Lorsque la colonie a atteint de 4 à 6 millimètres de diamètre, on y distingue un amas central opaque et une zone annulaire extérieure formée d'amas de Microcoques; l'anneau est relié au centre par des tractus déliés, de sorte que le tout rappelle assez bien l'aspect d'une roue de voiture.

Sur *gélatine* en piqûre, on voit se développer, au bout de quarante-huit heures, une colonie jaune. La liquéfaction se fait rapidement ; le liquide est clair et montre un sédiment jaune épais.

Sur *pomme de terre*, on obtient un épais revêtement jaune brillant.

Le *lait* est rapidement coagulé ; il s'y produit de l'acide lactique.

D'après Tissier et Martelly (1), ce microbe jouerait un rôle dans la putréfaction des viandes. Il pourrait attaquer les substances protéiques, mais surtout les peptones, avec production d'ammoniaque.

MICROCOCCUS FLAVUS DESIDENS Flugge (2).

C'est encore une espèce de l'air dont les éléments assez petits sont en diplocoques ou en courtes chaînettes.

Dans les cultures sur plaques, les colonies qui se développent à la surface sont arrondies, à bords sinueux, d'une coloration jaune légèrement brunâtre; elles peuvent atteindre 1 centimètre de diamètre. La gélatine ne se liquéfie pas à proprement parler, mais se ramollit et en même temps la colonie s'enfonce dans le substratum, montrant autour d'elle un cercle de dépression assez large.

En piqûre dans la gélatine, on obtient, à la surface, une membrane jaune, gluante, et, dans le canal, une masse blanchâtre. La gélatine se ramollit, puis se liquéfie lentement; la colonie tombe au fond en formant un sédiment jaune.

La culture sur pomme de terre donne une pellicule muqueuse jaune brunâtre.

MICROCOCCUS FLAVUS TARDIGRADUS Flugge.

Il s'observe dans les mêmes conditions que les précédents, mais plus rarement qu'eux.

(1) Tissier et Martelly, Recherches sur la putréfaction de la viande de boucherie (*Ann. de l'Inst. Pasteur*, XVI, 1902, p. 865).

(2) Flugge, Die Mikroorganismen, trad. franç. par Henrijean, 1887.

Il forme, à la surface des plaques de gélatine, des colonies rondes, de 1/2 à 1 millimètre de diamètre, d'une couleur jaune de chrome foncé, à surface lisse, vernissée, bombant légèrement sur la gélatine. La gélatine ne subit aucune liquéfaction.

Inoculé en piqûre sur gélatine, il est long à se développer et ne donne que quelques petites colonies jaunes globuleuses.

Les cellules sont sphériques, d'un diamètre assez fort, isolées ou formant de petits amas.

MICROCOCCUS DIFFLUENS Schroeter (1).

L'espèce a été isolée de la poussière et d'excréments; elle doit être commune dans l'air.

Les cellules elliptiques mesurent environ 1,5 μ de long sur 1 μ de large. Elles forment sur les milieux solides des masses muqueuses d'un blanc sale légèrement jaunâtre. Cette Bactérie ne liquéfie pas la gélatine; inoculée en strie, elle forme de chaque côté des prolongements d'apparence foliacée. La gelée environnante est colorée en jaune avec une fluorescence verdâtre. Le pigment est soluble dans l'eau; les acides le décolorent, les alcalis ne le modifient pas. A rapprocher peut-être du *Bacillus fluorescens putridus*.

MICROCOCCUS VERSICOLOR Flugge (2).

C'est une Bactérie de l'air, qui vient fréquemment contaminer les cultures sur plaques. Elle y forme, à la surface de la gélatine, une couche visqueuse jaune verdâtre, à reflets nacrés, pouvant atteindre jusque 1 centimètre de diamètre, de forme quadrangulaire irrégulière, à bords sinueux. Le centre est fréquemment surélevé. Les colonies qui se développent dans la profondeur de la gélatine sont circulaires, jaunâtres, finement granuleuses.

En piqûre, ce *Micrococcus* donne à la surface une pellicule jaunâtre nacrée, à bords irréguliers. La gélatine n'est pas liquéfiée.

Les cellules, rondes, d'assez faible diamètre, sont disposées en diplocoques ou en petits amas.

MICROCOCCUS CYANEUS Schroeter (3).

Il a été rencontré sur des pommes de terre cuites exposées à l'air. Il y forme une mince pellicule d'un bleu de cobalt. La gélatine n'est pas liquéfiée. La matière colorante pénètre dans le substratum et lui communique sa nuance; elle est soluble dans l'eau, vire au rouge-carmin lorsqu'on la traite par les acides et est ramenée au bleu par les alcalis. Très peu connue. C'est probablement le *Blauer-coccus* de Maschek (4).

MICROCOCCUS PSEUDO-CYANEUS Cohn (5).

Comme la précédente, cette espèce croît sur les pommes de terre

(1) Schroeter, Kryptogamenflora von Schlesien, III, v, p. 144.
(2) Flugge, Die Mikroorganisme, trad. franç. par Henrijean. Paris, 1887.
(3) Schroeter, Kryptogamenflora von Schlesien. Pilze, 1886, p. 145.
(4) Maschek, Bakteriologische Untersuchungen der Leitmeritzer Trinkwässer, 1887.
(5) Schroeter, Kryptogamenflora von Schlesien. Pilze, 1886, p. 145.

cuites et dans les solutions minérales : elle ne liquéfie pas la gélatine. Elle produit un pigment d'abord vert-de-gris, qui peut garder cette nuance ou devenir d'un bleu verdâtre ou bleu. Traité par les acides, il devient rouge et est ramené par les alcalis à sa nuance primitive.

Les caractères morphologiques de cette espèce, comme ceux de la précédente, ne sont pas suffisamment connus; les deux sont peut-être à rapprocher de certains Bacilles chromogènes.

ESPÈCES FERMENTS OU A ACTION INDIFFÉRENTE.

MICROCOCCUS UREÆ Van Tieghem.

Pasteur en a signalé la présence dans l'urine en 1862 (1), en lui attribuant dès ce moment la fermentation ammoniacale de ce liquide. Van Tieghem en a précisé plus tard les conditions de développement. D'après Miquel (2), plusieurs espèces de Microcoques et un assez grand nombre de Bacilles pourraient être les agents de cette fermentation ammoniacale; il décrit sous le nom d'*Urococcus* jusqu'à neuf espèces de ces *Micrococcus* ferments de l'urée, espèces dont plusieurs doivent se rapporter à des types déjà connus et dont l'action sur l'urée a passé inaperçue jusqu'ici.

Les cellules sont sphériques, mesurant de 1 μ à 1,5 μ de diamètre, réunies souvent en diplocoques et en tétrades, plus fréquemment en longues chaînes sinueuses. Cultivée dans de l'urine stérilisée et neutralisée, cette espèce se développe rapidement; le liquide est bientôt envahi par les chapelets, tout en conservant sa transparence. Il se forme, au fond, un dépôt blanchâtre, qui augmente au fur et à mesure que la fermentation s'accomplit ; ce dépôt est composé de cellules libres ou réunies en petit nombre, de cristaux d'urates et de phosphates ammoniaco-magnésiens. Au bout de peu de temps, un jour ou deux, toute l'urée a disparu, transformée en carbonate d'ammoniaque qui se dégage ou reste dissous dans le liquide. Au lieu d'urine, on peut employer une solution d'urée, obtenue pure de germes étrangers comme il a été indiqué page 210. On peut obtenir alors de très fortes proportions de carbonate d'ammoniaque sans voir périr la Bactérie; Van Tieghem en a vu former jusqu'à 13 p. 100 du liquide, qui était alors absolument impropre au développement des autres espèces accompagnant presque toujours le *Micrococcus ureæ*. Cette action s'accomplit rapidement dans le vide et sous une pression de trois atmosphères; le dédoublement se fait avec l'air, l'oxygène, l'azote, l'hydrogène, l'acide carbonique, le protoxyde d'azote (3). Cette fermentation ammoniacale de l'urée est due à une diastase, l'*uréase*, qu'a isolée Musculus (4) et que Pasteur et Joubert (5) ont montré être sécrétée par

(1) Pasteur, Mémoire sur les corpuscules organiques de l'atmosphère (*Ann. des sc. nat.*, *Zool.*, 1861).

(2) Miquel, Études sur la fermentation ammoniacale et sur les ferments de l'urée (*Ann. de micr.*, 1889. 1896).

(3) Ladureau, Sur le ferment ammoniacal (*C. R. de l'Acad. des sc.*, XCVIII, 1884, p. 877).

(4) Musculus, Sur le ferment de l'urine (*Ibid.*, LXXXII, 1876).

(5) Pasteur et Joubert, Sur la fermentation de l'urine (*Ibid.*, LXXXII 1876).

la Bactérie (Voy. p. 62). La fermentation marche au mieux lorsqu'il existe des matières albuminoïdes dans l'urine, lorsqu'on ajoute, par exemple, un peu de bouillon ou qu'on se sert d'urines de cystite riches en mucus. D'après l'excellent travail de Guiard (1), la transformation ammoniacale de l'urine dans la vessie exige, pour être durable et devenir un phénomène pathologique, le concours simultané de deux facteurs : les Bactéries et la cystite.

Cultivé sur gélatine, le *Micrococcus ureæ* donne des colonies homogènes, peu proéminentes, étalées en disque plat d'un blanc brillant, ressemblant à des gouttes de stéarine tombées sur la gelée. La gélatine n'est pas liquéfiée. Les vieilles cultures dégagent une odeur fade rappelant la colle d'amidon.

Cette espèce est très répandue ; il suffit d'exposer peu de temps à l'air un ballon rempli d'urine stérilisée et neutralisée, pour qu'on ait de grandes chances de la voir s'y développer, seule ou en compagnie d'autres. C'est probablement l'*Urococcus Van Tieghemi* de Miquel. Elle n'est du reste pas la seule Bactérie qui puisse provoquer le dédoublement de l'urée en carbonate d'ammoniaque ; plusieurs l'opèrent aussi bien qu'elle, entre autres le *Bacillus ureæ*, isolé par Miquel (2) de l'eau d'égout, de nombreuses autres espèces de Bacilles, étudiées par le même savant, plusieurs *Micrococcus* dont trois liquéfient la gélatine, et, d'après Leube (3), une *Sarcine*, mal déterminée jusqu'ici (Voy. *Bacillus ureæ*).

Flügge (4) a décrit sous le nom de *Micrococcus ureæ liquefaciens* un ferment de l'urée qui se distingue du précédent par la propriété qu'il présente de liquéfier la gélatine.

Les éléments sont des coccus ronds de 1,25 μ à 2 μ de diamètre, isolés, réunis en chaînes de 3 à 10 articles ou formant de petits amas. Ils forment sur gélatine une culture blanche assez abondante qui liquéfie assez rapidement la gelée. Du reste, trois des *Urococcus* de Miquel liquéfient la gélatine. D'après Burchard (5), la puissance d'action de cette espèce sur l'urée serait très forte, puisqu'il estime que 1 gramme de microbes bien actifs, en suspension dans l'eau, pourrait transformer, en une heure, de 180 à 1 200 grammes d'urée.

MICROCOCCUS NITRIFICANS Van Tieghem.

Les caractères morphologiques de l'espèce à laquelle ce nom a été appliqué n'ont pas encore été nettement indiqués jusqu'ici. Ce sont de très petites Bactéries sphériques que Schlœsing et Müntz (6) ont isolées de la terre végétale où elles abondent. Elles sont fréquentes dans l'eau

(1) Guiard, Études cliniques et expérimentales sur la transformation ammoniacale des urines. Thèse de Paris, 1883.

(2) Miquel, Recherches sur le Bacille ferment de l'urée (*Bull. de la Soc. chim.*, XXXII, 1879, p. 126, et *Ann. de micr.*, 1889 et 1890).

(3) Leube, Ueber die ammoniakalische Harngährung (*Virchow's Arch.*, C, p. 500).

(4) Flügge, Die Microorganismen, 1886, p. 169.

(5) Burchard, Beiträge zur Kenntniss des Ablaufs und der Grösse der durch Micrococcus ureae liquefaciens bevirkten Harnstoffzersetzung (*Arch. für Hygiene*, XXXVI).

(6) Schlœsing et Müntz, Recherches sur la nitrification (*C. R. de l'Acad. des sc.*, LXXXIX, p. 301, 891, 1704, 1879 et suiv.).

d'égout et très rares dans les eaux courantes; l'air et les poussières recueillies au-dessus du sol n'en renferment jamais.

La forme des cellules varie dans de larges limites; elles sont tantôt rondes, tantôt, plus souvent, ovales ou en courts bâtonnets. Il en est de même de la largeur qui passe du simple au double. Aussi est-il très rationnel de se ranger à l'opinion de Duclaux (1), qui pense que la dénomination de *Micrococcus nitrificans* comprend plusieurs espèces distinctes. L'emploi des méthodes actuellement connues permettrait peut-être de les isoler.

L'espèce décrite par ces auteurs est aérobie, mais peut se contenter de très faibles quantités d'oxygène. Sa propriété la plus intéressante est la production d'acide nitreux, puis d'acide nitrique aux dépens de l'ammoniaque qu'elle a à sa disposition. Le phénomène de nitrification est, dans de certaines limites, en rapport direct avec la température. Nulle au-dessous de 5°, l'action chimique ne devient bien appréciable que vers 12°; elle présente un maximum à 37°, puis décroît et s'éteint vers 50°-55°. Une température de 100° maintenue pendant quelques minutes détruit toute vitalité et toute action chimique.

Lorsque les conditions de température ou d'aération sont insuffisantes ou lorsque le ferment vieillit, le processus ne s'accomplit qu'en partie; il se produit des nitrites au lieu de nitrates.

Cette propriété de nitrification de l'ammoniaque semble peut-être appartenir, à des degrés divers cependant, à un certain nombre d'espèces bactériennes. Heraeus (2), P. et G. Frankland (3), Warington (4), Burri et Stutzer (5) disent l'avoir reconnue à plusieurs espèces de Bactéries de l'eau ou du sol. Les travaux les plus importants sur ce sujet sont sans contredit ceux de Winogradsky (6) qui est parvenu à isoler du sol plusieurs organismes spéciaux parmi lesquels paraît être le véritable ferment nitrique entrevu par Schlœsing et Müntz (7).

Le phénomène de la nitrification paraît passer par deux phases qui sont sous la dépendance d'espèces bactériennes différentes. Dans une première phase, certaines Bactéries du sol transforment l'ammoniaque en nitrites, sans pouvoir pousser plus loin la décomposition; ce sont les *Nitrosomonas* ou les *Nitrosococcus* de Winogradsky. Ce sont d'autres

(1) Duclaux, Chimie biologique, p. 711 et suiv.

(2) Heraeus, Ueber das Verhalten der Bacterien im Brunnenswasser sowie über reduciende und oxydirende Eigenschaften der Bacterien (*Zeitschr. für Hygiene*, VI, p. 373).

(3) P. et G. Frankland, Ueber einige typische Microorganisme im Wasser und im Boden (*Zeitschr. für Hygiene*, VI, p. 373).

(4) Warington, On nitrification (*Journ. of the Chemie Soc. Transactions*, II, 1891, p. 484).

(5) Burri et Stutzer, Ueber Nitrat zerstörende Bakterien und den durch dieselbne bedingten Stickstoffverlust (*Centralbl. für Bakt.*, 2te Abth., I, p. 257, 350, 392, 422). — Id., Ueber einen auf Nährgelatine gedeihenden nitratbildenden Bacillus (*Ibid.*, p. 721). — Id., Nitrification in Erdboden (*Ibid.*, II, 1896, p. 105). — Stutzer, Neue Untersuchungen über die Wirkund von Salpeterzerstörenden Bakterien in Nährlösungen (*Centralbl. für Bakt.*, 2te Abth., VII, 1901, p. 81).

(6) Winogradsky, Recherches sur les organismes de la nitrification (*Ann. de l'Inst. Pasteur*, IV, 1890, p. 213, 257, 760; V, 1891, p. 92 et 577). — Id., Morphologie des organismes de la nitrification (*Arch. des sc. biol. de Saint-Pétersbourg*, 1891, p. 87). — Id., Zur Mikrobiologie des Nitrifikationsprozesses (*Centralbl. für Bakt.*, 2te Abth., II, 1896, p. 415 et 447).

(7) Burri, Ueber Nitrification. Sammel-Referat (*Centralbl. für Bakt.*, 2te Abth., I, 1895, p. 22 et 80).

espèces, ses *Nitrobactéries*, qui oxydent les nitrites formés précédemment et les transforment en nitrates. C'est dans ses *Nitrosomonas* que doit se placer le ferment décrit par Schlœsing et Müntz; son *Nitrosomonas europea* semble devoir reprendre le nom de *Micrococcus nitrificans.*

Mais la nitrification de l'azote organique ne peut pas avoir lieu sous la seule action des microbes nitrificateurs. Il faut au préalable que cet azote ait passé à l'état d'ammoniaque, phénomène que déterminent beaucoup des espèces microbiennes communes dans la terre et les eaux.

Les cellules sont rondes ou ellipsoïdales chez le *Nitrosomonas* en pleine activité; elles ont au moins 1 μ de diamètre; les formes en pleine activité atteignent 1,8 μ et plus de longueur (fig. 233). Ces éléments sont la plupart du temps immobiles; ils présentent cependant de courtes périodes de mobilité. Lorsqu'ils sont au repos, ils sont réunis en petits amas par une matière gélatineuse très peu consistante; on peut même leur reconnaître une sorte de petite capsule.

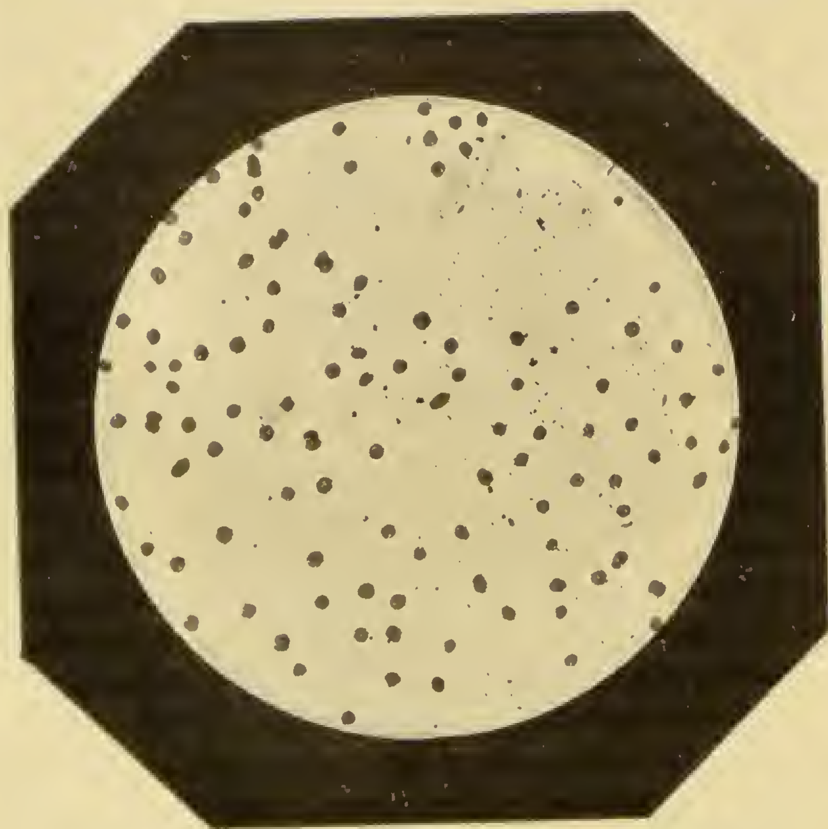


Fig. 233. — *Nitrosomonas* (d'après Winogradsky).

Le microbe qui transforme les nitrites en nitrates, le *Nitrobacter* de Winogradsky, est une Bactérie en bâtonnets très fins, immobiles, de 0,5 μ de long sur 0,2 μ de large, entourés d'une mince couche de gelée; ils se colorent mal aux couleurs d'aniline. On doit lui attribuer la dénomination de *Bacillus nitrificans.*

Ces espèces présentent comme caractère important de croître abondamment et exercer leur action nitrifiante dans un milieu absolument privé de matière organique; la présence de matières organiques entrave même la nitrification (1). C'est en employant des liquides de cultures complètement dépourvus de substances organiques que Winogradsky est parvenu à isoler ces ferments nitriques d'autres espèces qui l'accompagnent toujours. Le procédé des cultures sur plaques de gélatine ne donne aucun résultat; ces espèces ne croissent pas sur ce milieu, qui est au contraire rapidement envahi par les autres Bactéries.

Cependant Müntz et Lainé (2) ont montré que sous forme d'humus la matière carbonée était plutôt favorable à la nitrification.

(1) Winogradsky et Omeliansky, L'influence des substances organiques sur le travail des microbes nitrificateurs (*Arch. des sc. biol. de Saint-Pétersbourg*, VII, 1899, p. 233). — Omeliansky, Sur la nitrification de l'azote organique (*Ibid.*, p. 272).

(2) Muntz et Lainé, Rôle de la matière organique dans la nitrification (*C. R. de l'Acad. des sc.*, 19 février 1906).

En ajoutant au liquide de culture purement minéral un carbonate terreux, carbonate de chaux ou de magnésie, le ferment nitrique se fixe sur les particules du sel et les englobe d'une masse gélatineuse, de telle sorte que bientôt tout le dépôt est envahi et peut être entièrement dissous par le microbe.

Dans les liquides qui contiennent de petites quantités de sels ammoniacaux, la nitrification se fait régulièrement. En trois ou quatre jours, on a une belle réaction avec la diphénylamine. Quelques jours après, la réaction est très intense; une goutte du liquide de culture colore en bleu noir plusieurs centimètres cubes de la liqueur diphénylamique.

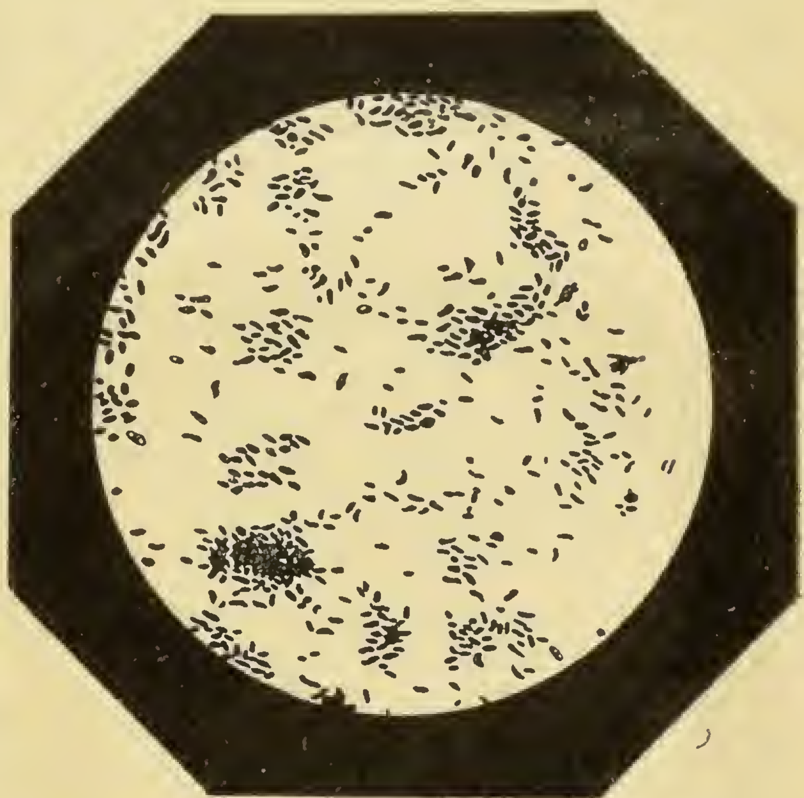


Fig. 234. — *Nitrobacter* (d'après Winogradsky).

Pour éviter d'une manière absolue la présence de toute trace de matière organique et profiter cependant des commodités qu'offrent les substances gélatinisantes pour l'isolement des microbes, Winogradsky s'est servi d'une solution aqueuse d'acide silicique, capable de se gélatiniser facilement sous certaines influences (Voy. p. 250). Il recommande d'étendre de trois fois son volume d'eau le *verre soluble* du commerce, de consistance trop épaisse. Cent centimètres cubes du liquide sont alors versés en agitant dans 50 centimètres cubes d'acide chlorhydrique étendu et le mélange mis dans un dialyseur. Au bout de trois jours, en laissant le dialyseur le premier jour dans l'eau courante, le reste du temps dans l'eau distillée souvent renouvelée, la solution est prête pour l'usage. On le reconnaît à ce qu'elle ne donne aucun trouble avec le nitrate d'argent. Elle peut alors être stérilisée par ébullition et conservée dans un ballon bouché avec de la ouate.

La solution nutritive est ainsi composée :

Sulfate d'ammoniaque	0,4
Sulfate de magnésie	0,05
Phosphate de potasse	0,1
Chlorure de calcium	Traces.
Carbonate de sodium	0,6 à 0,9
Eau distillée	100

Les sulfates et le chlorure d'un côté, le phosphate et le carbonate de l'autre sont dissous séparément et stérilisés à part et mélangés après refroidissement.

On concentre la solution silicique jusqu'à ce qu'elle soit réduite à moitié, puis on ajoute le tiers ou le quart de la solution saline, de façon à obtenir un milieu qui se gélatinise en cinq ou six minutes.

On se sert du milieu comme de la gélatine ordinaire. Les colonies des Bactéries de la fermentation nitrique y restent toujours très petites, à peine visibles à l'œil nu. D'autres organismes s'y développent également. Il est facile de distinguer les colonies des Nitrobactéries en les prélevant et les jetant dans un peu d'acide sulfurique additionné de diphénylamine; la colonie du ferment nitrique se colore en bleu intense. Boulanger et Massol (1) donnent des détails très précis sur la meilleure manière d'opérer pour l'isolement et la culture de ces microbes et ont mis en lumière des points intéressants de leur biologie.

P. et G. Frankland, Burri et Stutzer ont isolé des eaux et de la terre d'autres espèces de *Bacilles nitrifiants*, se distinguant de celui de Winogradsky par les dimensions plus fortes, par la mobilité et la possibilité de se cultiver sur les milieux ordinaires; mais Winogradsky a démontré que ces auteurs avaient expérimenté avec des cultures impures où, à côté du microbe nitrifiant vrai, existaient d'autres espèces dépourvues de tout pouvoir nitrifiant; ces dernières seules donnent des cultures sur les milieux ordinaires employés.

D'après Stutzer et Hartleb (2), tous les microbes nitreux et nitriques isolés par Winogradsky ne seraient que des phases diverses de l'évolution d'une Mucédinée polymorphe, leur *Salpeterpilz*, qui présenterait une phase mycélienne, une phase de macrospores et une de microspores; la forme mycélienne seule pourrait vivre aux dépens de matière organique, les deux autres n'attaqueraient que l'ammoniaque. Ces idées n'ont pas été confirmées.

Les microbes nitrifiants sont très largement répandus dans le sol et les eaux.

Dans le sol, l'action de ces espèces est intimement liée à celle des ferments des matières azotées, et en particulier de l'espèce précédente, le *Micrococcus ureæ*. Le dernier terme complexe de la transformation de l'azote des substances azotées est le carbonate d'ammoniaque qui n'est pas assimilable pour les plantes. Il ne le devient qu'à la suite de sa transformation en nitrates alcalins par les Bactéries du sol et rentre ainsi dans la circulation vitale. On peut donc concevoir le rôle considérable qui revient à ces espèces dans la nutrition de la plante et s'expliquer les curieuses observations de Duclaux (3) sur la germination dans un sol privé de Bactéries. Les plantes que l'on obtient par ce procédé restent aussi grêles que celles qui poussent dans l'eau pure. Elles sont privées de l'action si énergique des Bactéries qui leur préparent leurs aliments sous une forme très assimilable, directement ou à l'aide de leurs puissantes diastases.

De nombreuses Bactéries peuvent attaquer les nitrates ainsi formés par les microbes nitrifiants, et donner des composés de plus en plus simples jusqu'à l'azote gazeux, opérer une *dénitrification*. Ces *microbes*

(1) Boulanger et Massol, Étude sur les microbes nitrificateurs (*Ann. de l'Inst. Pasteur*, XVII, 1903, p. 492, et XVIII, 1904, p. 181).

(2) Stutzer et Hartleb, Der Salpeterpilz (*Centralbl. für Bakt.*, 2ᵉ Abth., III, 1897, p. 6, 54, 161, 235, 311 et 351).

(3) Duclaux, Sur la germination dans un sol riche en matières organiques, mais exempt de microbes (*C. R. de l'Acad. des sc.*, C, 1886, p. 68).

dénitrifiants appauvrissent le sol en composés utiles; leur action est défavorable à ce point de vue (1). On verra que parmi ces espèces se trouvent, comme espèces très actives, le *Vibrion cholérique*, le *Vibrion de Metschnikoff*, le *Bacille de la dysenterie* (type Flexner), le *Bacille paratyphique B*; comme moins actives, le *Bacille typhique*, le *Colibacille*, le *Bacille pyocyanique*, le *Bacille fluorescent liquéfiant*, le *Bacillus enteriditis*, le *Proteus vulgaris*. Il est de ces microbes qui ont une action dénitrifiante directe, décomposant d'emblée les nitrates et dégageant de l'azote, tel le *Bacille pyocyanique*. D'autres, *Bacille typhique* et *Colibacille* par exemple, dénitrifient indirectement, en réduisant les nitrates en nitrites qui agissent sur les substances amidées du milieu, mettant en liberté de l'azote et de l'acide carbonique (2).

MICROCOCCUS OBLONGUS Boutroux.

Cette espèce a été isolée de la bière par Boutroux (3). Les cellules mesurent de 1 μ à 2 μ de diamètre, selon l'âge; les vieilles sont plus petites. Elles sont isolées, réunies par deux ou en grand nombre, en chapelets longs et flexueux. Il se formerait, dans des cultures âgées, de longs filaments qui, transportés dans un nouveau milieu nutritif, se segmenteraient aussitôt en *Micrococcus*.

Le milieu de culture le plus favorable est une solution de glucose, additionnée de petites quantités de tartrate d'ammoniaque et de phosphate de soude. Quelques heures après l'ensemencement, le liquide se recouvre d'un voile très léger qui, au bout de vingt-quatre heures, devient blanc velouté et, après deux jours, laisse pendre de longs filaments dans le liquide. Ce voile se brise avec une grande facilité. L'espèce est aérobie ; ce mode de végétation suffit à le montrer. Le liquide devient rapidement acide ; aussi, si l'on veut observer un développement abondant, faut-il ajouter de la craie au fond du vase, pour neutraliser l'acide produit. Au bout de trois ou quatre jours, il se dégage sous le voile quelques bulles d'acide carbonique. Le dégagement gazeux s'arrête du dix-huitième au vingtième jour. Vers le vingt-cinquième jour, on distingue sur la craie une mince couche de cristaux qui augmente rapidement. Ils sont formés par le sel de chaux d'un acide identifié par Boutroux avec l'acide glyconique ; ce qui a fait donner au mode spécial de transformation du glucose, sous l'influence de cette Bactérie, le nom de fermentation glyconique.

(1) Stutzer et Maul, Ueber nitratzerstörende Bakterien (*Centralbl. für Bakt.*, 2te Abth., II, 1896, p. 473). — Hjalmar Jensen, Beiträge zur Morphologie und Biologie der Denitrifikations Bakterien (*Ibid.*, IV, 1898, p. 401 et 449). — Marpmann, Ueber Denitrifikationsvorgänge in der Natur (*Ibid.*, V, 1899, p. 67). — Serverin, Zur Frage über die Zersetzung von Salpeter sauren Salzen durch Bakterien (*Ibid.*, III, 1897, p. 504 et 554). — Maassen, Die Zersetzung der Nitrate und der Nitrite durch Bakterien. (*Arb. aus dem kaiserl. Gesundheitsamte*, XVIII, 1901, p. 21).

(2) Grimbert et Bagros, Sur le mécanisme de la dénitrification chez les Bactéries dénitrifiantes indirectes (*Soc. de Biol.*, LXVI, 1909, p. 760).

(3) Boutroux, Sur une fermentation nouvelle de la glucose (*Ann. de l'École normale supérieure*, 1880).

MICROCOCCUS VISCOSUS Pasteur.

Pasteur a montré que cette espèce était la cause d'une altération spéciale du vin et de la bière, connue sous le nom de *graisse* (1). Le liquide contaminé se trouble, puis prend, au bout de peu de temps, une consistance visqueuse ; il peut devenir filant comme du blanc d'œuf, d'où le nom de *vin filant* qu'on lui donne.

Le *Micrococcus*, cause de la maladie, a des éléments sphériques de 1 μ de diamètre en moyenne, avec d'assez fortes variations en plus ou en moins. Ces coccus sont rarement isolés, parfois réunis par deux, mais le plus souvent en longues chaînes flexueuses (fig. 235). Il sécrète une gomme particulière, que Béchamp (2) nomme *viscose* ; c'est elle qui donne au liquide où végète l'espèce sa consistance spéciale. Il se cultive très bien dans les solutions de sucre de canne, qu'il rend fortement visqueuses, même lorsqu'elles ne renferment que de faibles proportions, 1 p. 100, de sucre. Le sucre de canne seul peut subir la fermentation visqueuse ; dans les mêmes circonstances, le sucre interverti, le glucose, le maltose ne produisent pas de viscose, mais peuvent donner de la mannite.



Fig. 235. — *Micrococcus viscocus* d'une bière filante. A côté des chapelets de coccus, on observe de nombreux globules de Levure de bière (d'après Pasteur).

Le liquide de culture, solution sucrée, vin, bière ou cidre, dégage une odeur fade.

Un certain nombre d'autres espèces de Bactéries possèdent aussi la propriété de rendre visqueux les liquides où on les cultive. Elles la doivent très probablement aussi à la production du même principe gommeux. Il n'est pas possible encore de préciser les rapports qu'elles ont avec celle en question, les particularités des cultures n'étant pas suffisamment connues. Les espèces décrites par Duclaux sous le nom d'*Actinobacter polymorphus* et par Van Laer (3) sous le nom de *Bacillus viscosus*, que nous étudierons plus loin, possèdent aussi à un haut degré la propriété de rendre visqueux les liquides où elles se développent. D'autres Micrococques (p. 606), plusieurs espèces de Bacilles rendent le lait visqueux.

L'urine devient aussi fréquemment visqueuse ; elle peut même l'être dès l'émission. On ne connaît pas l'espèce ou les espèces de Bactéries qui occasionnent ce phénomène. Pietro Albertoni (4), analysant une urine visqueuse, a constaté que la viscosité était due à un hydrate de carbone. Ce corps précipite par l'alcool, le sulfate de cuivre et la soude ; chauffé avec l'acide sulfurique, il donne la réaction du furfurol. Cette substance serait produite par un Bacille décrit par Brazzola (5).

(1) Pasteur, Études sur le vin, 1886 et 1872.

(2) Béchamp, Sur la viscose ou substance gommeuse de la fermentation visqueuse (*C. R. de l'Acad. des sc.*, XCII, 1881, p. 78).

(3) Van Laer, Note sur les fermentations visqueuses (*Mém. de l'Acad. roy. des sc. de Belgique*, 1889, et *C. R. de la station scientifique de brasserie de Gand*, t. I, 1890).

(4) Pietro Albertoni, *Ann. di Chimica e Farmacia*, X, p. 367.

(5) Brazzola, *Acc. d. sc. dell'Inst. di Bologna*, IX, p. 7, 85.

MICROCOCCUS GRISEUS NON LIQUEFACIENS
TISSIER et MARTELLY.

Tissier et Martelly (1) donnent ce microbe comme fréquent dans les viandes en putréfaction ; on le rencontre tout au début de l'altération aussi bien qu'après un long temps.

C'est un gros diplocoque, isolé, en amas ou en courtes chaînes de quatre à cinq éléments. Dans les vieilles cultures, on trouve souvent des formes allongées ou renflées. Il se colore bien à l'aide des procédés ordinaires et *reste coloré* par la méthode de Gram.

Il pousse bien dans les milieux ordinaires, à 22° comme à 37°. La vitalité y est assez grande pour qu'on puisse encore le réensemencer après trois semaines. Il paraît être facultativement anaérobie.

Sur *gélatine*, en piqûre, le microbe pousse dans les vingt-quatre heures en donnant de petites colonies rondes le long du canal. La gélatine n'est pas liquéfiée.

Sur *gélose*, à 37° après vingt-quatre heures, on obtient de petites colonies gris blanchâtre qui s'accroissent lentement et deviennent plus transparentes, à centre plus clair et bords plus épais. Sur gélose glucosée, le développement est plus abondant ; en inoculation profonde, elle développe dans toute la hauteur de petites colonies lenticulaires, sans production gazeuse.

Le *bouillon* est trouble en vingt-quatre heures; il s'y forme un dépôt blanchâtre, pulvérulent.

Le *lait* n'est pas coagulé.

Sur *pomme de terre*, il n'y a pas de culture apparente.

Le *blanc d'œuf cuit*, la fibrine ne sont pas attaqués.

Ce microbe agit sur le glucose aux dépens duquel il donne des acides gras ; l'action s'arrête quand l'acide atteint environ 1 p. 100 en acide sulfurique. Il n'agit pas sur le lactose.

Il n'a pas d'action sur les substances protéiques naturelles, mais attaque les peptones en produisant de l'indol et de l'ammoniaque. Il transforme l'urée en ammoniaque.

MICROCOCCUS AQUATILIS MEADE BOLTON.

Meade Bolton (2) a décrit sous ce nom une espèce qu'il a isolée d'eaux potables et dont il ne donne que les caractères des cultures sur plaques. A un grossissement moyen, les jeunes colonies, qui se trouvent dans l'épaisseur de la gélatine, sont rondes, avec un contour denté et une apparence mûriforme; elles ont une coloration jaune brillant. Dès qu'elles viennent émerger à la surface, elles s'étendent. A l'œil nu, elles forment alors des taches circulaires aplaties, d'un blanc de porcelaine. Au microscope, on leur distingue des contours nets, une zone marginale mince, homogène, et une partie centrale d'un aspect tout particulier. Du centre, plus sombre, part en rayonnant un système de sillons qui

(1) TISSIER et MARTELLY, Recherches sur la putréfaction de la viande de boucherie (*Ann. de l'Inst. Pasteur*, XVI, 1902, p. 875).
(2) MEADE BOLTON, Ueber das Verhalten verschiedener Bacterienarten im Trinkwasser (*Zeitschr. für Hygiene*, I, 1886, p. 76).

découpe cette partie en petits îlots rhombiques, l'aspect de la figure rappelant le schéma connu d'un acinus du foie. La gélatine n'est pas liquéfiée. Sur gélose, on a une couche blanche.

Les coccus sont très petits, immobiles, et restent colorés par la méthode de Gram.

D'après Bolton, le *Micrococcus aquatilis* serait une des espèces les plus communes de l'eau. Il végéterait très facilement dans ce liquide et se multiplierait même abondamment dans l'eau distillée.

MICROCOCCUS CANDICANS Flugge (1).

Il est très fréquent sur les cultures sur plaques et abonde dans l'air et dans l'eau.

Les cellules sont grandes, régulièrement sphériques, de 1 μ à 2 μ de diamètre, immobiles, réunies en amas irréguliers.

Sur *plaques de gélatine*, les colonies qui se développent dans la profondeur forment de petits disques jaunâtres, d'un demi-millimètre environ. A un faible grossissement, elles paraissent circulaires, à bords lisses, colorées en brun sombre et faiblement granuleuses. Celles qui se trouvent à la surface sont de petites taches d'un blanc de lait, atteignant 2 millimètres en deux jours, à surface lisse et brillante ; à un faible grossissement, leurs contours paraissent irréguliers et sinueux ; elles sont finement granuleuses et ont un centre brun sombre. La gélatine n'est jamais liquéfiée.

En piqûre dans la gélatine, on a une culture en clou blanche. L'aspect est le même sur la gélose. Sur pomme de terre, la culture est blanche, brillante, porcelanée.

MICROCOCCUS CANDIDUS Cohn.

C'est aussi une espèce commune dans l'air et l'eau.

Ce sont de petits coccus immobiles, de 0,5 μ à 0,7 μ de diamètre, donnant sur les plaques de gélatine de petites taches d'un blanc de neige, arrondies, puis irrégulières, ne liquéfiant jamais la gelée. Le développement dans les différents milieux paraît beaucoup plus lent que celui de l'espèce précédente.

MICROCOCCUS FERVIDOSUS Adametz.

Adametz (2) l'a isolé de l'eau.

Les coccus, ronds et immobiles, mesurent 0,6 μ de diamètre et sont réunis en diplocoques ou en petits amas. Leur végétation est extraordinairement lente dans les cultures.

Sur *plaques de gélatine*, les colonies qui se développent dans la profondeur apparaissent, après quatre à cinq jours, comme de petits points blancs. A un faible grossissement, elles paraissent ovoïdes, faiblement jaunâtres, à contours nets, et ont une grande ressemblance avec des

(1) Flugge, Les microorganismes, trad. franç. Paris, 1887.
(2) Adametz, *Loc. cit.*, p. 599.

gouttes de rosée. Celles qui arrivent à la surface sont bien plus grandes ; elles gagnent, au bout de cinq à six jours, un bord dentelé et même sinueux ; elles sont grisâtres ou d'un blanc un peu jaunâtre. Les vieilles colonies sont granuleuses et brunâtres au centre ; la zone périphérique, jaunâtre, montre un plissement peu accentué. La gélatine n'est pas liquéfiée.

Sur *gélatine*, en piqûre, il se forme à la surface un petit disque rond, très mince, transparent, sans reflet nacré, et de fines granulations dans le canal.

Sur *gélose*, on obtient des colonies arrondies d'un blanc laiteux ou une bande muqueuse de même nuance.

Sur *pomme de terre*, une culture d'un blanc sale.

Les solutions sucrées se troublent rapidement ; il s'y développe vers 30°, en deux jours, une fermentation énergique. Le liquide, après fermentation, contient jusqu'à 1 p. 100 d'alcool et des traces d'acide acétique et d'acide lactique.

Dans la gélatine sucrée et glycérinée vers 22°, il apparaît, le long de la piqûre, de grosses bulles de gaz qui tendent à remonter lentement à la surface.

MICROCOCCUS CONCENTRICUS Zimmermann.

Il a été isolé de l'eau par Zimmermann (1).

Ce sont des coccus de 0,9 µ de diamètre, disposés en amas irréguliers.

Sur *plaques de gélatine*, les colonies situées dans la gélatine apparaissent à l'œil nu comme de petits points d'un gris bleu. Arrivées à la surface, elles s'élargissent et donnent des disques arrondis, d'un gris bleuté, qui grandissent et prennent des contours irréguliers. En cinq jours, la colonie peut atteindre 3 millimètres de diamètre. A un grossissement moyen, les colonies incluses dans la gelée sont brunâtres ou gris jaunâtre, et montrent plusieurs cercles concentriques assez réguliers. Celles de la surface ont au centre un disque gris brun, plus sombre, à bords irrégulièrement crénelés, présentant çà et là des fissures radiaires ; ce centre est entouré d'un anneau sinueux, bordé d'un liséré blanchâtre brillant. La gélatine n'est pas liquéfiée.

En piqûre dans la *gélatine*, il se forme à la surface, autour de la piqûre, un revêtement gris bleuâtre, montrant des zones concentriques nettes.

Sur *gélose* et sur *pomme de terre*, on obtient une culture mince, grisâtre.

MICROCOCCUS COULEUR CRÈME.

List (2) en a décrit un dont les éléments très gros, de 1,5 µ à 2,2 µ, immobiles, sont isolés, réunis par deux ou en longues chaînettes. Les colonies sur plaques sont de petites gouttes muqueuses, d'un jaune-crème. La gélatine n'est pas liquéfiée.

Une autre espèce a été décrite par Zimmermann sous le nom de

(1) Zimmermann, Die Bacterien unserer Trink-und Nutzwässer, 1890.
(2) Adametz, Die Bacterien der Trink-und Nutzwässer. Vienne, 1888.

Micrococcus cremoides. Les coccus, de 0,8 μ de diamètre, sont réunis en petits amas.

Sur *plaques de gélatine*, les colonies incluses dans la gelée sont de petits disques granuleux, jaunâtres ou brun grisâtre. Dès qu'elles arrivent à la surface, elles perdent leurs contours réguliers et la gélatine se liquéfie en cupule autour d'elles. Il se forme dans la cupule un dépôt blanc jaunâtre, qui présente aussitôt des anneaux concentriques. A un grossissement moyen, on observe uniquement des pelotes jaunâtres, granuleuses, autour desquelles se trouve une zone granuleuse moins épaisse, et qui sont entourées d'un liquide transparent; à la périphérie se trouvent souvent de fins prolongements radiaires qui pénètrent dans la gelée ambiante.

En piqûre, la *gélatine* se liquéfie en trois ou quatre jours à la température ordinaire. La cupule de liquéfaction mesure de 3 à 5 millimètres de diamètre ; à sa surface, on observe habituellement un creux donnant l'illusion d'une bulle de gaz. Au dixième jour, la liquéfaction atteint les parois du tube. Le liquide est clair et montre un dépôt blanc jaunâtre.

Sur *gélose*, on obtient, en trois ou quatre jours, une culture blanc jaunâtre, ambrée, luisante. Sur *pomme de terre*, une couche de couleur crème.

Ces deux espèces ont été trouvées dans l'eau.

MICROCOCCUS RADIATUS Flugge.

C'est aussi un saprophyte de l'eau.

Les coccus, peu mobiles, mesurent de 0,8 μ à 1 μ; ils sont isolés, en courtes chaînettes ou en petits amas.

Sur *plaques de gélatine*, en deux jours, les colonies ont atteint 1 millimètre de diamètre. Elles sont blanches avec un reflet jaune verdâtre, présentent parfois des prolongements qui les font ressembler à des étoiles de mer. La gélatine est déjà liquéfiée. Deux jours après, il se forme, aux dépens des prolongements, une couronne radiée, délicate et régulière. Après deux ou trois jours, il peut se développer une seconde couronne, puis une troisième, à rayons plus courts et irréguliers. La colonie a 1 centimètre à $1^{cm},5$ de diamètre.

Sur *gélatine*, en piqûre, il part, du trait d'inoculation, de nombreux prolongements radiaires; puis il se forme un entonnoir de liquéfaction qui progresse très lentement.

Sur *pomme de terre*, la culture, qui croît rapidement, est colorée en jaune brun.

MICROCOCCUS CORONATUS Flugge.

C'est une espèce de l'air, dont les éléments, qui ont un peu plus de 1 μ de diamètre, sont isolés, réunis en amas ou en courtes chaînes.

Sur *plaques de gélatine*, les colonies sont de petits disques opaques, d'où partent, en deux ou trois points, de courts prolongements symétriques. La liquéfaction du milieu commence; autour du centre, il se forme un anneau entourant la partie centrale comme d'une auréole.

MICROCOCCUS POLYPUS Migula.

Migula (1) l'a obtenue de l'air, comme impureté dans des cultures.

Ce sont des coccus de 1 μ de diamètre environ, isolés, en diplocoques, rarement en tétrades.

Sur *plaques de gélatine*, les cultures sont très particulières. Les colonies sont d'abord punctiformes, grisâtres, à bords lisses ; puis des bords partent des prolongements irréguliers qui s'allongent sur la surface de la gelée, rappelant l'apsect des bras d'un polype, mais de dimensions très variables. Il ne se produit pas de liquéfaction.

Sur *gélatine*, en piqûre, le développement est minime dans le canal ; par contre, à la surface il produit une colonie à aspect de polype, comme la culture sur plaques. La gélatine n'est pas liquéfiée.

Sur *gélose*, la culture est blanche, épaisse, à bords sinueux.

MICROCOCCUS CORALLOIDES Zimmermann.

Zimmermann (2) l'a rencontré dans l'eau.

Ce sont de petits coccus immobiles, réunis en amas plus ou moins considérables, se colorant bien aux procédés ordinaires et restant colorés par la méthode de Gram.

Sur *plaques de gélatine*, les colonies, d'abord très petites, blanchâtres, granuleuses, émettent vers le troisième jour, à leur périphérie, des prolongements qui vont en rayonnant dans toutes les directions ; ils deviennent après six à huit jours bien visibles à l'œil nu et sont souvent ramifiés. La gélatine qu'ils parcourent est alors à demi liquéfiée. L'aspect, au microscope surtout, rappelle un buisson de corail.

Sur *gélatine*, en piqûre, il se forme à la surface une culture d'un blanc laiteux, à reflets bleuâtres, d'où partent plus tard des tractus rayonnants ; la culture s'enfonce dans la gélatine qui est lentement liquéfiée. Le long de la piqûre, s'observe une bande blanche. Au voisinage de la culture, la gelée prend une teinte jaune foncé.

Sur *gélose*, la culture est assez abondante, d'un blanc de lait.

Sur *pomme de terre*, les colonies sont très maigres, blanchâtres, peu visibles.

Le *bouillon* est troublé rapidement ; il laisse déposer un fin sédiment blanchâtre.

MICROCOCCUS STELLATUS Maschek.

(*Stern Coccus.*)

Maschek (3) le rencontre dans les eaux pauvres en Bactéries.

Les coccus sont toujours isolés, immobiles.

Sur *plaques de gélatine*, les colonies atteignent facilement 2 millimètres de diamètre. Du centre, brunâtre, partent alors de 6 à 15 prolongements radiaires, finement ramifiés à leur extrémité, donnant à la colonie l'aspect d'une étoile régulière. La gelée ne se liquéfie pas.

(1) Migula, System der Bakterien, 1900, II, p. 79.
(2) Zimmermann, *Loc. cit.*, p. 599.
(3) Maschek, *Loc. cit.*, p. 588.

Sur *gélatine*, en piqûre, il se forme d'abord à la surface une petite colonie discoïde, puis jaune brunâtre ; plus tard, de la piqûre partent des prolongements radiaires qui se ramifient finement dans le milieu. La gélatine n'est pas liquéfiée.

Sur *pomme de terre*, on observe tardivement une membrane muqueuse, jaune brunâtre.

MICROCOCCUS NACRACEUS Tataroff.

(*Perlmutterglänzender Diplococcus.*)

Tataroff l'a isolé de l'eau (1).

Les éléments, de 0,8 μ, sont en diplocoques, rarement isolés.

Sur *plaques de gélatine*, les colonies profondes sont de petites sphères blanches. Les colonies superficielles sont arrondies, blanches, à reflets bleuâtres ou irisés : au microscope, elles ont l'aspect granuleux, brunâtre, et montrent vers le milieu un épaississement excentrique. Il ne se produit pas de liquéfaction.

Sur *gélatine*, en piqûre, il se forme à la surface une colonie mince, nacrée, qui se creuse au milieu et dans le canal une petite tige de même reflet. La gélatine n'est pas liquéfiée et se colore en jaune brunâtre.

Sur *gélose*, la colonie est blanc bleuâtre, nacrée.

Sur *pomme de terre*, on a une colonie d'un blanc sale, avec reflets verdâtres, dans laquelle se forment plus tard de petites bulles de gaz.

MICROCOCCUS CINEREUS Zimmermann.

(*Streptococcus cinereus.*)

Il a été trouvé dans l'eau par Zimmermann (2).

Les éléments sont de petits coccus de 0,7 μ, disposés en chaînes, immobiles. Ils se colorent bien aux méthodes ordinaires et *restent colorés* par la méthode de Gram. C'est une espèce aérobie qui croît très lentement, au mieux vers 18°. Les cultures périssent vite.

Sur *plaques de gélatine*, les colonies apparaissent en vingt-quatre heures. Celles de la profondeur, au microscope, sont de petits disques circulaires, presque incolores ; en quarante-huit heures, elles ont pris une teinte jaunâtre. Celles de la surface ont une certaine irrégularité de contours qui disparaît vite ; ce sont d'abord de petites gouttelettes transparentes grisâtres qui, en huit à dix jours, atteignent 2 millimètres à 2^{mm},5 de diamètre et forment une colonie à surface ondulée, gris jaunâtre.

Sur *gélatine*, en piqûre, il se forme à la surface une petite culture en tête d'épingle, d'abord grise, puis un peu jaunâtre. Presque rien dans le canal. La gélatine n'est pas liquéfiée.

Sur *gélose*, un mince revêtement grisâtre, brillant.

Sur *pomme de terre*, la culture est très minime, à peine appréciable.

(1) Tataroff. Die Dorpater Wasserbakterien. Thèse de Dorpat, 1891.
(2) Zimmermann, *Loc. cit.*, p. 599.

MICROCOCCUS ROSETTACEUS Zimmermann.

Zimmermann (1) l'a trouvé dans l'eau.

Les éléments sont sphériques ou ovalaires, de 0,7 μ à 1 μ, disposés en amas irréguliers, immobiles. Ils se colorent bien aux procédés ordinaires et *restent colorés* par la méthode de Gram.

Les cultures sont faciles à obtenir, se développent vite, au mieux à la température de la chambre, exclusivement en présence d'air.

Sur *plaques de gélatine*, les colonies profondes sont de petits grains d'un blanc grisâtre, à contours bien délimités. Celles de la surface sont de petites gouttelettes gris jaunâtre, brillantes, à contours sinueux, qui ne liquéfient pas. A un grossissement moyen, elles paraissent brunes, ont un centre plus foncé et des bords plus clairs.

Sur *gélatine*, en piqûre, il se forme à la surface une colonie un peu surélevée, irrégulièrement arrondie, formant une sorte de rosette; presque rien dans le canal. La gélatine n'est pas liquéfiée.

Sur *gélose*, la culture est grisâtre, lisse, brillante, à bords dentés.

Sur *pomme de terre*, la culture est assez épaisse, d'un jaune verdâtre.

Dans le *bouillon*, il se produit d'abord un trouble uniforme, puis à la surface un voile mince, et au fond un dépôt floconneux grisâtre.

MICROCOCCUS PLUMOSUS Brautigam.

Il a été trouvé par Braütigam (2) dans des drèches et du fumier de bœuf, par Adametz (3) dans l'eau.

Ce sont des coccus immobiles, de 0,8 μ, réunis en amas serrés.

Sur *plaques de gélatine*, les colonies se développent vite et émettent des prolongements en languettes qui rampent à la surface du milieu. Elles ne produisent pas de liquéfaction.

Sur *gélatine*, sur piqûre, la culture est très caractéristique. Du canal partent de longs prolongements blanchâtres, très fins, qui parcourent la gelée; ceux qui arrivent à la surface s'y terminent par un petit bouton blanc. La culture a l'aspect finement plumeux. La gélatine n'est pas liquéfiée.

Sur *pomme de terre*, on a une colonie muqueuse, d'un blanc jaunâtre, dont les bords émettent des prolongements linguiformes.

Les sucres ne sont pas fermentés.

MICROCOCCUS VITICULOSUS Katz.

Il a été trouvé dans l'air et dans l'eau (4).

Les coccus sont ovalaires, de 1 μ sur 1,2 μ, réunis en amas compacts.

Sur *plaques de gélatine*, les colonies profondes émettent des prolongements très fins, en forme de vrilles, qui s'étendent sur une assez

(1) Zimmermann, *Loc. cit.*, p. 599.

(2) Brautigam, Untersuchungen über die Mikroorganismen in Schlämpe und Bertrabern. Thèse de Leipzig, 1886.

(3) Adametz, Die Bakterien der Trink-und Nutzwässer. Vienne, 1888, p. 12.

(4) Flugge, Die Mikroorganismen, 1886, p. 178.

grande surface. Au microscope, ces vrilles paraissent formées de petites Zooglées globuleuses. Les colonies superficielles sont larges, blanchâtres, émettant de nombreux prolongements très fins dans la gelée sous-jacente. Il ne se produit pas de liquéfaction.

Sur *gélatine*, en piqûre, il se forme le long du canal une culture muqueuse d'où partent de nombreux filaments très fins qui parcourent la gelée. La gélatine n'est pas liquéfiée.

Sur *pomme de terre*, le développement se fait vite; la culture est membraneuse, sèche, d'un blanc sale.

D'après Maschek, ce microbe ferait activement fermenter le glucose.

MICROCOCCUS VERMIFORMIS Maschek.

Il est signalé comme fréquent dans l'eau par Maschek (1).

Les éléments, qui ont parfois une forme de bâtonnets, sont disposés en chaînes qui sont fréquemment animées d'un mouvement vermiforme lent.

Sur *plaques de gélatine*, les colonies, d'un blanc jaunâtre, s'enfoncent dans la gelée. On leur distingue une partie centrale claire, entourée d'un anneau de liquéfaction un peu plus clair, qui lui-même est entouré d'un rebord blanchâtre. A un faible grossissement, le bord des colonies montre de fines stries radiaires; l'intérieur est brunâtrement granuleux.

Sur *gélatine*, en piqûre, la liquéfaction se fait rapidement, de la surface à l'intérieur de la piqûre.

Sur *pomme de terre*, on obtient une culture d'un jaune sale, qui grandit peu.

MICROCOCCUS MIRABILIS Roscoe et Lunt.

(*Streptococcus mirabilis.*)

Ce microbe a été isolé d'eau d'égout par Roscoe et Lunt (2).

Ce sont des coccus isolés, ou des diplocoques, formant de très longues chaînes, tout à fait immobiles. Les coccus ont 0,4 μ de diamètre, les diplocoques jusqu'à 1,2 μ de long.

Sur *plaques de gélatine*, la croissance se fait mal. Les colonies profondes ne sont, après quatre jours, que de petits points microscopiques, petits amas de filaments pelotonnés. Les colonies superficielles sont minimes et transparentes, quelques-unes peuvent atteindre 2 millimètres de diamètre. A un faible grossissement, on s'aperçoit qu'elles constituent des amas de longs filaments et envoient parfois de fins tractus dans la gelée ambiante. Il ne se produit pas de liquéfaction. Les colonies n'augmentent plus après cinq ou six jours.

Sur *gélatine*, en piqûre, il se forme à la surface un revêtement de filaments très fins et transparents, difficile à voir à l'œil nu, atteignant en quelques jours 3 à 5 millimètres de diamètre, puis cessant d'augmenter. La gélatine n'est jamais liquéfiée.

Sur *gélose*, la culture ressemble à celle sur gélatine.

Sur *pomme de terre*, il n'y a pas de culture visible.

(1) Maschek, *Loc. cit.*, p. 588.

(2) Roscoe et Lunt, Contributions to the chemical Bacteriology of Sewage (*Philosoph. Transact. of Roy. Soc.*, CLXXXII, 1892, p. 648).

Dans le *bouillon*, le développement se fait en quarante-huit heures : dans le fond du tube, il se forme des amas floconneux, semblables à du coton, ou bien on trouve des filaments très ténus répartis dans le liquide qui reste absolument clair. Le développement s'y fait aussi bien en aérobie qu'en anaérobie.

MICROCOCCUS ALBICANS.

On peut attribuer ce nom à un *Streptocoque à cultures blanches*, trouvé dans l'eau par Tataroff (1).

Les coccus, de 1 μ en moyenne, sont le plus souvent unis en chaînes plus ou moins longues, mais aussi parfois isolés ou en diplocoques. Ils se colorent légèrement et se *décolorent* par la méthode de Gram.

Sur *plaques de gélatine*, les colonies apparaissent comme de petits points blancs. Celles de la surface forment de petits disques d'un blanc brillant, à partie centrale un peu surbaissée. La gélatine n'est pas liquéfiée.

Sur *gélatine*, en piqûre, on obtient une culture blanche dans le canal et à la surface un disque blanc brillant (blanc de fard); jamais de liquéfaction.

Sur *gélose*, on a une culture assez large, blanche.

Sur *sérum coagulé*, un mince revêtement visqueux, blanc de lait.

Sur *pomme de terre*, une mince couche transparente, brillante, devenant blanc de lait à la longue, puis plus épaisse et visqueuse.

Dans le *bouillon*, il se fait un trouble uniforme et un dépôt blanchâtre floconneux.

Les milieux deviendraient assez nettement acides.

MICROCOCCUS ALBUS Maschek.

(*Streptococcus albus.*)

C'est une espèce isolée de l'eau et de l'air par Maschek (2).

Ce sont des coccus de 0,8 μ, isolés, en diplocoques ou en chaînettes plus ou moins longues, paraissant souvent mobiles quand ils ne sont pas en chaînes.

Sur *plaques de gélatine*, ce microbe forme de petites colonies plates, arrondies, prenant bientôt l'aspect de coquille d'huître, à centre plus épais entouré d'un rebord blanc. La gélatine est rapidement liquéfiée.

Sur *gélatine*, en piqûre, le dévelopement se fait surtout en surface avec le même aspect que précédemment. La gélatine est rapidement liquéfiée et laisse déposer un sédiment blanchâtre.

Sur *pomme de terre*, la croissance est rapide et donne une large culture blanchâtre muqueuse.

(1) Tataroff, Die Dorpater Wasserbakterien. Thèse de Dorpat, 1891.

(2) Maschek, Bakteriologische Untersuchungen der Leitmeritzer Trinkwässer (*Jahrb. der Oberrealeschule zu Leitmeritz*, 1887).

MICROCOCCUS SORNTHALII Adametz.

D'après Adametz (1), c'est une espèce fréquente dans le lait, pouvant aussi se rencontrer dans les fromages.

Les éléments sont des coccus ronds ou ovoïdes, de 0,7 μ de diamètre moyen, isolés, en diplocoques ou en petits amas, rarement en tétrades ou en courtes chaînes, arrangés souvent en rosettes dans les cultures dans le lait.

Sur *plaques de gélatine*, les cultures apparaissent vite sous forme de petits points blancs; celles de la surface s'étalent en petits disques muqueux d'un blanc sale ou un peu grisâtres, présentant des stries concentriques. La gélatine n'est jamais liquéfiée.

Sur *gélatine*, en piqûre ou en strie, il se forme des colonies muqueuses, blanchâtres ou un peu jaunes. Le même aspect se produit sur *gélose*.

Ce microbe fait rapidement fermenter le sucre de lait avec dégagement gazeux formé d'acide carbonique et d'hydrogène. Dans le lait, en outre, la caséine est précipitée; il se forme de l'acide lactique.

Ce serait un des organismes produisant la boursouflure des fromages.

MICROCOCCUS FREUDENREICHII Guillebeau.

Il a été isolé par Guillebeau (2) d'un *lait visqueux*.

Ce sont de gros coccus de 2 μ et plus de diamètre, fréquemment disposés en chaînettes, surtout dans les cultures en bouillons.

Les cultures sur *gélatine* sont blanches et liquéfient rapidement la gelée. Les cultures sur *pomme de terre* sont jaune de soufre, parfois un peu brunâtres.

Le *lait* devient rapidement acide, puis filant; il est coagulé en quelques jours.

On a décrit d'autres Micrococques qui rendent le lait visqueux. Le *Micrococcus mucilaginosus*, de Ratz (3), donne, sur plaques de gélatine, de petites colonies blanches, sphériques, ne liquéfiant pas; le lait est faiblement coagulé et devient visqueux à la longue. Hohl (4) a décrit sous le nom de *Carphococcus pituitoparus*, qui doit devenir *Micrococcus pituitoparus*, un coccus isolé de la litière de paille, donnant sur gélatine de petites colonies rondes d'un blanc brillant, non liquéfiantes; le lait n'est pas coagulé, mais devient rapidement très visqueux dans ses couches supérieures et ne devient jamais acide, mais plutôt légèrement alcalin. Le *Micrococcus lactis viscosi* de Gruber (5) donne de petites colonies blanches, très visqueuses, qui liquéfient rapidement la gélatine; le lait est coagulé, puis en partie peptonisé, devient rapidement filant et prend une réaction d'abord alcaline, puis finalement acide.

(1) Adametz, Ueber Micrococcus Sornthalii (*Centralbl. für Bakt.*, 2[te] Abth., I, 1895, p. 465).

(2) Guillebeau, Ueber fadenziehende Kuhmilch (*Schweizer. Arch. für Thierheilk.*, XXXIV, 1892, p. 128).

(3) Ratz, Ueber die Schleimige Milch (*Arch. für Thierheilk.*, XII, 1890).

(4) Hohl, Ein neuer, aus Stroh isolierter, das Fadenziehen der Milch verursachender Coccus (*Centralbl. für Bakt.*, 2[te] Abth., IX, 1902, p. 338).

(5) Gruber, Beitrag zur Kenntniss der Erreger der schleimigen und Fadenziehenden Milch und Charakterisierung des Coccus lactis viscosi (*Ibid.*, p. 785).

MICROCOCCUS DU LAIT AMER Conn.

Conn (1) l'a isolé d'une crème à saveur amère très marquée.

Gros coccus, disposé souvent en diplocoques et formant de courtes chaînettes dans certains milieux, sur gélose principalement.

Il liquéfie très rapidement la *gélatine*; le liquide est très visqueux. Les cultures sur *gélose* ont une couleur blanche; celles sur *pomme de terre* sont d'un blanc brillant. Dans le *bouillon*, il forme un mince voile à la surface et rend le milieu épais, muqueux. Le *lait* se coagule en un jour; il est acide et fortement amer.

Freudenreich (2) a décrit, sous le nom de *Micrococcus casei amari*, un microbe très voisin de celui de Conn; il liquéfie la gélatine et coagule rapidement le lait qu'il rend fortement acide et amer. Il se produit jusqu'à 4 grammes d'acide lactique par litre. Ce Microcoque a été isolé d'un fromage devenu amer.

D'autres espèces microbiennes produisent également l'amertume du lait ou de ses dérivés. Hueppe (3) cite le *Bacillus butyricus*, Lœffler (4) le *Bacillus liodermos* et le *Bacillus mesentericus vulgatus*, Freudenreich le *Bacillus liquefaciens lactis amari*, O'Callaghan (5) le *Saccharomyces lactis*, Harrison (6) la *Torula amara*.

ESPÈCES ANAÉROBIES.

MICROCOCCUS FŒTIDUS Rosenbach.

Rosenbach (7) a isolé d'une carie dentaire une Bactérie à éléments très petits, ovales, se colorant difficilement.

C'est une espèce anaérobie, qui ne se développe que dans le fond des tubes de gélose, inoculés par une piqûre profonde. La culture s'accompagne d'une production de gaz d'odeur fétide.

MICROCOCCUS FŒTIDUS Veillon.

Veillon (8) l'a rencontré dans des pus fétides; Hallé l'a rencontré dans le vagin à l'état normal; Guillemot et Collet dans la gangrène pulmonaire (9); Jeannin dans plusieurs cas d'infection puerpérale putride.

(1) Conn, Ueber einen bittere Milch erzeugenden Micrococcus (*Centralbl. für Bakt.*, IX, 1881, p. 653).

(2) Freudenreich, *Ann. de micr.*, VII, 1895, p. 1.

(3) Hueppe, Untersuchungen über die Zersetzung der Milch durch Mikroorganismen (*Mitth. aus dem kaiserl. Gesundheitsamte*, II, 1884, p. 309). — Ueber Milch sterilisierung und über bittere Milch mit besonderer Rücksicht auf die Kinderernahrung (*Berl. klin. Wochenschr.*, 1891, p. 717).

(4) Loeffler, *Berl. klin. Wochenschr.*, 1878, p. 630.

(5) O'Callaghan, *New South Wales Agr. Gaz.*, X, 1899, p. 882.

(6) Harrison, Bitter Milk and Cheese (*Centralbl. für Bakt.*, 2te Abth., IX, 1902, p. 206).

(7) Rosenbach, Mikroorganismen bei der Wundinfectionskrankheiten. Wiesbaden, 1884.

(8) Veillon, Sur un Microcoque strictement anaérobie trouvé dans des suppurations fétides (*Soc. de Biol.*, juillet 1893).

(9) Guillemot, Recherches sur la gangrène pulmonaire. Thèse de Paris, 1898.

Jungano (1) le signale comme fréquent dans l'urètre normal chez l'enfant des deux sexes et dans diverses infections génito-urinaires. Les coccus sont isolés ou plus souvent en diplocoques immobiles, formant parfois de petites chaînettes dans les bouillons. Ils se colorent bien aux méthodes ordinaires et *restent colorés* par la méthode de Gram.

C'est un anaérobie strict, poussant très bien à 37° et plus lentement à 22°.

Dans la *gélose glucosée*, il donne, après un jour ou deux, de grosses colonies blanches. La gelée se fend par suite du développement de gaz.

Dans la *gélatine glucosée*, il donne, en trois ou quatre jours, de petites colonies rondes, jaunâtres. La gélatine n'est pas liquéfiée, mais fendue par de nombreuses bulles de gaz.

Dans le *bouillon*, il produit un trouble uniforme.

Il produit des gaz et dégage une odeur très fétide.

Il est pathogène pour le cobaye et le lapin, mais irrégulièrement.

Il est peut-être identique au *Streptocoque anaérobie* signalé par Menge et Kronig (2) dans le vagin; toutefois, il est plutôt en diplocoques; les chaînettes sont rares, alors qu'elles sont presque constantes pour ce dernier.

MICROCOCCUS PARVULUS Veillon et Zuber.

(*Staphylococcus parvulus.*)

Veillon et Zuber (3) le donnent comme fréquent dans le pus d'appendicite. Guillemot (4) l'a rencontré dans la gangrène pulmonaire.

C'est un très petit coccus immobile, disposé en amas, par deux ou isolés, jamais en chaînettes. Il se colore facilement, mais d'une façon peu intense. Il se *décolore* par la méthode de Gram.

C'est un anaérobie strict.

Il croît lentement dans la *gélatine glucosée*, vers 22°, et y forme, après une huitaine, de petites colonies granuleuses, brunâtres, ayant souvent une forme cuboïde, qui ne liquéfient pas le milieu.

Dans la *gélose glucosée*, la croissance est rapide à 37°; il s'y forme d'assez grosses colonies jaunes; la gelée est parfois fragmentée par le développement de gaz.

Le *bouillon* est rapidement et uniformément troublé.

Le *lait* n'est pas modifié.

Le *blanc d'œuf* cuit n'est pas attaqué.

Les cultures dégagent une odeur fétide.

Le microbe est pathogène pour le lapin et le cobaye, mais ne produit souvent qu'un abcès au point d'inoculation.

(1) Jungano, La flore bactérienne de l'urètre normal et pathologique de l'homme (*Ann. des mal. génito-urinaires*, novembre 1908).

(2) Menge et Krönig, Bakteriologie des weiblichen Genitalkanales. Leipzig, 1897.

(3) Veillon et Zuber, Recherches sur quelques microbes strictement anaérobies et leur rôle dans la pathologie humaine (*Arch. de méd. expér.*, juillet 1898).

(4) Guillemot, *Loc. cit.*, p. 607.

MICROCOCCUS RENIFORMIS Cottet.

(*Diplococcus reniformis.*)

Il a été isolé des suppurations péri-urétrales (1).

Les coccus sont asymétriques, disposés en diplocoques, rappelant beaucoup le *Gonocoque*, mais, dans le pus, se trouvant le plus souvent hors des cellules.

Ils se colorent assez bien aux méthodes ordinaires et se *décolorent* par la méthode de Gram.

C'est un anaérobie strict.

Il ne croît pas sur *gélatine*.

Sur *gélose glucosée*, les cultures apparaissent en trente-six à quarante-huit heures, à 37°. Ce sont de très petites colonies blanches, avec reflet bleuté, qui, après quelques jours, deviennent mûriformes sans grossir.

Le *bouillon* est troublé en vingt-quatre heures, puis s'éclaircit après quelques jours.

Le *lait* n'est pas coagulé.

Le *blanc d'œuf cuit* n'est pas attaqué.

Les *sucres* ne sont pas modifiés.

On n'observe pas de dégagement gazeux, mais une odeur putride.

Inoculé sous la peau du cobaye, il produit un abcès.

MICROCOCCUS MAGNUS ANAEROBIUS Tissier et Martelly.

(*Diplococcus magnus anaerobius.*)

Tissier et Martelly (2) l'ont rencontré dans le cours d'une putréfaction de viande.

C'est un gros coccus, isolé ou le plus souvent en diplocoques à grains asymétriques, parfois en amas ou en courtes chaînettes, se colorant bien par les méthodes ordinaires et *restant coloré* par la méthode de Gram.

Sa vitalité, en cultures, est assez grande; il est encore bien vivant après trois semaines. Il pousse à partir de 22°, avec son optimum à 37°.

Dans la *gélatine*, les colonies apparaissent très lentement, dans le fond du tube ; elles ont un aspect floconneux.

Dans la *gélose glucosée*, en inoculation profonde, les colonies apparaissent en vingt-quatre heures à 37° et s'arrêtent à 2 centimètres de la surface. Après quatre à cinq jours, elles ont atteint de 1 à 2 millimètres de diamètre. Vues à un faible grossissement, elles semblent formées de cercles concentriques ; leur centre est épais, blanc, les zones sont plus claires ; les bords sont finement découpés, la surface granuleuse. Il ne se forme pas de gaz.

Le *bouillon* se trouble peu à peu, puis s'éclaircit après quatre à cinq jours, et montre un dépôt visqueux.

Le *lait* n'est pas modifié.

Le *blanc d'œuf cuit* n'est pas attaqué.

(1) Cottet, Recherches bactériologiques sur les suppurations péri-urétrales. Thèse de Paris, 1899.

(2) Tissier et Martelly, Recherches sur la putréfaction de la viande de boucherie (*Ann. de l'Inst. Pasteur*, XVI, 1902, p. 865).

Les *sucres* ne sont pas modifiés.

Il n'attaque pas les substances protéiques naturelles, mais les peptones en donnant de l'ammoniaque, jamais d'indol. Il est sans action sur les sucres. Il dédouble l'urée en carbonate d'ammoniaque. Il semble très favorisant pour le *Bacillus perfringens*.

MICROCOCCUS ORBICULUS Tissier.

(*Diplococcus orbiculus.*)

Cette espèce est fréquente dans les selles de jeunes enfants (1).

Ce sont de gros diplocoques asymétriques, deux à trois fois plus gros que le *Gonocoque*, se colorant bien aux colorants ordinaires et se *décolorant* par la méthode de Gram.

C'est un anaérobie strict qui ne pousse qu'à 37°. Sa vitalité ne dépasse guère six à huit jours.

Dans la *gélose glucosée* profonde, il donne en trente-six ou quarante-huit heures de grosses colonies lenticulaires, blanchâtres, peu épaisses et presque transparentes. Il ne se forme jamais de gaz.

Dans la *gélatine*, à 22°, on n'a pas de développement.

Le *bouillon* est légèrement troublé ; il s'y forme un petit dépôt grumeleux.

Le *lait* n'est pas coagulé.

Le *blanc d'œuf cuit* n'est pas modifié.

Le *glucose* est attaqué avec formation d'acide ; le *lactose* l'est faiblement ; le *saccharose* pas du tout.

Il ne se produit pas d'indol dans les milieux peptonés.

Ce microbe n'a aucune action pathogène.

MICROCOCCUS JUNGANO.

(*Staphylocoque de Jungano.*)

Il a été rencontré dans une urine de cystite, dans une infiltration gangreneuse du périnée, dans l'urètre normal de l'homme, et existe presque constamment dans l'urètre des petites filles et des petits garçons. On l'a retrouvé dans diverses infections oculaires et dans les matières fécales (2).

Les éléments sont des coccus arrondis, de très petite taille, réunis en amas de staphylocoques, se colorant bien aux méthodes ordinaires et *restant colorés* par la méthode de Gram.

C'est un anaérobie strict, qui végète à 22° peu abondamment et bien à 37°. La vitalité est très grande ; elle persiste des mois dans les cultures.

Sur *gélose glucosée*, les colonies apparaissent entre quarante-huit et soixante heures, souvent en vingt-quatre heures dans les réensemencements. Elles sont petites, luisantes, et avec l'âge deviennent biconvexes avec centre foncé et zone périphérique plus claire.

Sur *gélatine glucosée*, à 22°, il pousse, en cinq à six jours, de petites colonies rondes, transparentes ; la gélatine n'est pas liquéfiée.

(1) Tissier, Recherches sur la flore intestinale normale des enfants âgés de un à cinq ans (*Ann. de l'Inst. Pasteur*, XII, 1908, p. 204).

(2) Jungano et Distaso, Les anaérobies. Paris, Masson, 1910, p. 194.

Le *bouillon* est troublé en trente-six heures, puis s'éclaircit peu à peu.
Le *lait* n'est pas modifié.
Le *blanc d'œuf cuit* n'est pas attaqué.
Il n'a d'action sur aucun des différents *sucres*.
Ce microbe ne sécrète aucune toxine.
Il est pathogène pour le cobaye et le lapin.

MICROCOCCUS ANAEROBIUS MICROS Lewkowicz.

Lewkowicz (1) décrit sous le nom de *Streptococcus anaerobius micros* un Micrococque anaérobie trouvé dans la bouche de nourrissons. Lippmann (2) l'a isolé de plusieurs cas d'infections des voies biliaires et Jeannin (3) d'infections puerpérales.

C'est un petit coccus de 0,25 μ à 0,4 μ, avec éléments parfois un peu allongés en diplocoques ou en chaînettes courtes dans les milieux solides, longues dans les bouillons.

Les éléments se colorent bien aux méthodes ordinaires et *restent colorés* par la méthode de Gram.

La vitalité est assez notable. C'est un anaérobie strict qui ne végète que vers 37°.

Dans la *gélose glucosée*, il donne en profondeur, après deux à trois jours, de petites colonies arrondies, assez transparentes, lisses.

Dans le *bouillon sucré*, il forme un dépôt pulvérulent, assez abondant.

Le *lait* n'est pas modifié.

Ce microbe n'a aucune action pathogène.

Sternberg (4) a trouvé un autre *Streptocoque anaérobie* dans les crachats d'un malade atteint d'actinomycose pulmonaire. Ce sont de gros coccus ronds ou ovalaires, de 2 μ et plus de diamètre, formant des chaînes, se colorant bien aux procédés ordinaires et *restant colorés* par la méthode de Gram.

Dans la *gélose glucosée* et la *gélatine glucosée*, il donne de petites colonies blanches à partir de 22°.

Sur *pomme de terre*, les colonies sont de tout petits grains blancs.

Sur *sérum*, il se forme des petites colonies transparentes.

Inoculé sous la peau du lapin, il donne de petits abcès.

Pour arriver à une détermination plus rapide des principales espèces du genre *Micrococcus* étudiées ici, on peut se servir des tableaux suivants. Le premier indique l'action sur la gélatine et la coloration générale des colonies. Le second est un résumé des principaux caractères qui peuvent servir. La distinction des espèces des différents groupes se fera plus

(1) Lewkowicz, Recherches sur la flore microbienne de la bouche des nourrissons (*Arch. de méd. expér.*, 1901, p. 633).
(2) Gilbert et Lippmann, Bactériologie des cholécystites (*Soc. de Biol.*, 1902, n° 30).
(3) Jeannin, Recherches bactériologiques sur l'utérus dans ses rapports avec le traitement local de l'infection puerpérale (*Bull. de la Soc. d'obstétr. de Paris*, 1907).
(4) Sternberg, Ein anaërober Streptokokkus (*Wiener klin. Wochenschr.*, 1900, p. 551).

complètement en se reportant aux descriptions données. Il n'est question ici que des espèces aérobies ; les anaérobies, très peu nombreuses, seront plus facilement distinguées en se reportant aux descriptions données pages 607 et suivantes.

1° *Liquéfient la gélatine.*

a. Colonies blanches ou grises :

M. albus (p. 605).
M. casei amari (p. 607).
M. coralloides (p. 601).
M. coronatus (p. 600).
M. cremoides (p. 600).
M. decalvans (p. 547).
M. epidermidis albus (p. 548).
M. Freudenreichii (p. 606).
M. gonorrheæ (p. 518).
M. lactis viscosi (p. 606).
M. de la mammite de la brebis (p. 554).
M. neoformans (p. 546).
M. pyogenes albus (p. 450).
M. pyosepticus (p. 454).
M. radiatus (p.600).
M. ureæ liquefaciens (p. 590).
M. vermiformis (p.604).

b. Colonies jaunes :

M. blanc jaunâtre de l'urètre (p. 536).
M. flavus desidens (p.587).
M. flavus liquefaciens (p. 587).
M. jaune citrin de l'urètre (p. 535).
M. ochroleucus (p. 536).
M. pyogenes aureus (p. 441).
M. pyogenes citreus (p. 451).
M. subflavus (p. 535).
M. sulphureus (p. 586).

c. Colonies rouges ou rosées :

M. carnicolor (p. 583).
M. cumulatus (p. 583).
M. persicus (p. 583).
M. rosaceus (p. 583).
M. rubiginosus (p. 583).
M. subcarneus (p. 583).

d. Colonies brunes :

M. fuscus (p. 581).

2° *Ne liquéfient pas la gélatine.*

a. Colonies blanches ou grises :

M. albicans (p. 605).
M. albicans amplus (p. 538).
M. albicans tardissimus (p. 540).
M. aquatilis (p. 597).
M. candicans (p. 598).
M. candidus (p.598).
M. catarrhalis (p. 516).
M. cereus albus (p. 451).
M. cinereus (p. 602).
M. concentricus (p. 599).

M. couleur crème de List (p. 599).
M. enteritis (p. 483).
M. fervidosus (p. 598).
M. de la gourme du cheval (p. 562).
M. griseus non liquefaciens (p. 597).
M. lacteus faviformis (p. 537).
M. de la mammite de la vache (p. 551).
M. melitensis (p. 540).
M. mirabilis (p. 604).
M. mucilaginosus (p. 606).
M. nacraceus (p. 602).
M. Pasteuri (p. 469).
M. pituitoparus (p. 606).
M. plumosus (p. 603).
M. polypus (p. 601).
M. pyogenes (p. 455).
M. rosettaceus (p. 603).
M. Sornthalii (p. 606).
M. stellatus (p. 601).
M. tetragenus (p. 490).
M. ureæ (p. 589).
M. viticulosus (p. 603).

b. Colonies jaunes :

M. aurantiacus (p. 585).
M. cereus flavus (p. 452).
M. citreus conglomeratus (p. 536).
M. flavus tardigradus (p. 587).
M. jaune non liquéfiant de l'urètre (p. 536).
M. luteus (p. 586).
M. versicolor (p. 588).
M. viridis flavescens (p. 452).

c. Colonies rouges ou rosées:

M. agilis (p. 583).
M. bicolor (p. 583).
M. carneus (p. 582).
M. cerasinus (p. 582).
M. cinnabareus (p. 583).
M. cinnabarinus (p. 583).
M. coccineus (p. 582).
M. lactericeus (p. 582).
M. roseus (p. 582).
M. rubescens (p. 585).
M. sublilacinus (p. 585).

d. Colonies bleues :

M. cyaneus (p. 588).
M. pseudocyaneus (p. 588).

e. Colonies brunes :

M. brunneus (p. 581).
M. fulvus (p. 581).

Tableau résumant les caractères les plus import

DÉSIGNATION DES ESPÈCES.	HABITAT	CARACTÈR		
		SUR PLAQUES DE GÉLATINE.	SUR GÉLATINE.	SUR GÉLOS
Micrococcus agilis, p. 583	Eau.	Petites colonies rosées, non liquéfiantes.	Culture rose. Ne liquéfie pas.	Culture rose bre.
M. albicans, p. 605	Eau.	Petites colonies blanches, n n liquéfiantes.	Culture blanche. Ne liquéfie pas.	Culture blan
M. albicans amplus, p. 538	Mucus vaginal.	»	Ne liquéfie pas. Bande grisâtre, nuageuse.	Bande gri visqueuse.
M. albicans tardissimus, p. 540....	Pus d'écoulements urétraux.	»	Ne liquéfie pas. Croît très lentement; mince culture grisâtre.	»
M. albus, p. 605	Air et eau.	Colonies blanches liquéfiantes.	Culture blanche. Liquéfie rapidement.	»
M. aquatilis, p. 597	Eaux.	Culture blanc jaunâtre mûriforme dans la gelée. Disque blanc de porcelaine à la surface.	Ne liquéfie pas.	Culture blan
M. aurantiacus, p. 585	Air.	Disque jaune-orange brillant.	Liquéfie et donne un dépôt orange.	Couche j épaisse.
M. bicolor, p. 583	Intestin d'oiseaux.	Colonies rondes rosées.	Culture rose. Ne liquéfie pas.	Culture rou
M. candicans, p. 598	Air et eau.	Larges disques d'un blanc brillant, à contours sinueux.	Ne liquéfie pas; culture blanche en clou.	»
M. candidus, p. 598	Air et eau.	Petites taches d'un blanc de neige, ne liquéfiant pas.	Culture blanche; ne liquéfie pas.	»
M. carneus, p. 582	Eau.	Disques rougeâtres.	Culture rouge. Ne liquéfie pas.	Culture rosé.
M. catarrhalis, p. 516	Mucus buccal et rhino-pharyngien.	»	Culture lente à 20°. Ne liquéfie pas.	Petites co grisâtres.
M. cerasinus, p. 582	Lait rouge.	Colonies bombées rouge-cerise.	Colonie rouge à la surface. Ne liquéfie pas.	Culture rose
M. cereus albus, p. 451	Pus.	Colonies rondes, à bords lisses, formant à la surface de petites taches blanches.	Ne liquéfie pas. Culture blanc grisâtre; la colonie de la superficie ressemble à une pellicule de cire blanche.	Large pe d'un blanc gr à bords sinueu semblant à de blanche.
M. cereus flavus, p. 452	Pus.	Comme l'espèce précédente, mais les colonies sont jaune-citron.	Cultures ressemblant à de la cire jaune ne liquéfiant pas.	»
M. cinereus, p. 602	Eau.	Colonies transparentes.	Culture grisâtre. Ne liquéfie pas.	Culture gri

cipales espèces du genre *MICROCOCCUS*.

TERRE.	EN BOUILLON.	CARACTÈRES DES ÉLÉMENTS.	COLORATION A LA MÉTHODE DE GRAM.	ACTION BIOLOGIQUE.	OBSERVATIONS PARTICULIÈRES.
ou cul-	Trouble et anneau rosé à la surface.	Coccus de 1 μ, mobiles.	Positive.	Saprophyte.	Pigment rose.
ure lai-	Trouble et dépôt floconneux.	Coccus de 1 μ, en longues chaînes.	Négative.	Saprophyte.	»
anche.	Trouble et dépôt blanc.	Diplocoques asymétriques; chaque couple mesure de 3 μ à 3,5 μ.	Positive.	Ne paraît pas être pathogène.	»
	»	Diplocoques asymétriques.	Positive.	Ne paraît pas être pathogène.	»
anche.	»	Coccus de 0,8 μ, en diplocoques mobiles ou en chaînettes.	»	Saprophyte.	»
	»	»	»	Saprophyte.	»
	Mince pellicule jaune d'or.	Coccus elliptiques de 1,5 μ de grand diamètre.	»	Saprophyte.	»
	Trouble et dépôt rouge.	Diplocoques ou courtes chaînes.	Positive.	Saprophyte.	Facultativement anaérobie.
	»	Coccus sphériques isolés ou en petits amas.	»	Saprophyte.	»
	»	Coccus immobiles de 0,5 à 0,7 μ.	»	Saprophyte.	»
rouge	»	Coccus de 0,8 μ en amas ou tétrades.	Positive.	Saprophyte.	Pigment rosé.
ès mi-	Trouble et dépôt.	Diplocoques asymétriques.	Négative.	Saprophyte probable.	Ne végète qu'à partir de 20°.
	Dépôt blanc, liquide clair.	Coccus en staphylocoques.	Positive.	Saprophyte.	Colore le *lait* en rouge à la surface. Pas de coagulation.
risâtre, au mi-	Développement rapide vers 30°.	Coccus de 0,6 μ à 1,16 μ.	»	Ne paraît pas être pathogène.	»
	»	»	»	Ne paraît pas être pathogène.	»
ès peu	»	Coccus de 0,7 μ, en chaîne.	Positive.	Saprophyte.	»

Tableau résumant les caractères les plus impor

DÉSIGNATION DES ESPÈCES.	HABITAT.	CARACTÈ		
		SUR PLAQUES DE GÉLATINE.	SUR GÉLATINE.	SUR GÉLO
M. cinnabareus, p. 583	Air.	Petits boutons d'un rouge terne.	Ne liquéfie pas. Culture abondante, rouge-brique un peu rose.	Large c rouge-brique
M. cinnabarinus, p. 583	Eau.	Colonies rosées.	Culture rouge. Ne liquéfie pas.	Culture ro
M. citreus conglomeratus, p. 536	Pus blennorragique.	Petites taches jaunes, homogènes, granuleuses.	Colonies jaune-citron qui se fendillent en vieillissant. Ne liquéfie pas.	Culture ja abondante e jours.
M. coccineus, p. 582	Fromage.	Colonies rosées.	Culture rose. Ne liquéfie pas.	Culture ro
M. concentricus, p. 599	Eau.	Les colonies de la gelée ont des cercles concentriques.	Revêtement gris bleuâtre à cercles concentriques.	Culture mi sâtre.
M. corallinus, p. 583	Air.	Colonies rosées.	Culture rouge, liquéfiant très lentement.	Culture tr rosâtre.
M. coralloides, p. 601	Eau.	Colonie en forme de corail.	Culture blanche rameuse. Liquéfie lentement.	Culture bl
M. coronatus, p. 600	Air.	Colonies avec auréole radiaire.	Liquéfaction rapide.	»
M. cremoides, p. 600	Eau.	Colonies blanc jaunâtre, liquéfiantes.	Culture blanche liquéfiante.	Culture bl nâtre.
M. cumulatus, p. 583	Intestin d'oiseaux.	Colonies rouge jaune.	Culture rose. Liquéfie lentement.	Culture ro
M. diffluens, p. 588	Air.	»	Ne liquéfie pas. Masse muqueuse jaune sale. Colore la gelée en jaune avec une fluorescence verdâtre.	Pellicule ja
M. enteritis, p. 483	Contenu intestinal normal et pathologique.	»	Développement très lent. Ne liquéfie pas.	Petites transparente
M. epidermidis albus, p. 548	Peau.	»	Culture blanche liquéfiant très lentement.	Culture bl odeur butyri
M. fervidosus, p. 598	Eau.	Les colonies de la surface ressemblent à des gouttes de rosée ; les vieilles deviennent granuleuses et brunâtres ; pas de liquéfaction.	En piqûre, petit disque transparent à la surface et fines granulations dans le canal. Ne liquéfie pas.	»
M. flavus desidens, p. 587	Air.	Colonies arrondies à bords sinueux, jaune légèrem. brunâtre, pouv. atteindre 1 c. La gélatine se ramollit autour.	Membrane jaune gluante à la surface. Liquéfie lentement.	»

ncipales espèces du genre *MICROCOCCUS*.

…TERRE.	EN BOUILLON.	CARACTÈRES DES ÉLÉMENTS.	COLORATION A LA MÉTHODE DE GRAM.	ACTION BIOLOGIQUE.	OBSERVATIONS PARTICULIÈRES.
…uqueuse …n clair …rs.	Trouble persistant; dépôt rougeâtre, cohérent et visqueux.	Coccus ovoïdes de 0,9 μ, isolés, en couples ou en tétrades.	»	Saprophyte.	Odeur fade.
…pénible.	Trouble, voile rougeâtre.	Coccus ou diplocoques.	Positive.	Saprophyte.	Pigment rouge.
	Trouble dès la 15e heure à 35°. Dépôt très abondant en trois jours.	Coccus de 1 μ de diamètre, réunis en diplocoques, assez mobiles.	Positive.	Ne paraît pas être pathogène.	»
	»	Diplocoques ou staphylocoques.	Positive.	Saprophyte.	Ne coagule pas le *lait*; le colore en rose à la surface.
…ince gri-	»	Coccus de 0,9 μ, en staphylocoques.	»	Saprophyte.	»
	Trouble léger, dépôt rosé.	Coccus isolés ou staphylocoques.	Positive.	Saprophyte.	Pigment rouge. Le *lait* n'est pas coagulé et montre un dépôt rosé; pas de coloration à la surface.
petites.	Trouble.	Petits coccus en amas.	Positive.	Saprophyte.	»
	»	»	»	»	»
blanc-	»	Coccus de 0,8 μ, en amas.	Positive.	Saprophyte.	»
	Trouble et dépôt rosé.	Coccus ou diplocoques.	»	Saprophyte.	Pigment rose.
	»	Coccus elliptiques de 1,5 μ de long.	»	Saprophyte.	»
culture	Trouble et dépôt nuageux.	Diplocoques ou chaînettes.	Positive.	Pathogène pour la souris.	Saprophyte ordinaire, mais pouvant devenir pathogène.
…lanc gri-	Trouble et dépôt floconneux.	Coccus de 1,5 μ à 2 μ.	Positive.	Saprophyte pouvant devenir irritant.	Morocoque de Unna.
	Fermentation énergique dans les liquides sucrés.	Coccus ronds immobiles, de 0,6 μ, en diplocoques ou en petits amas.	»	»	Dans la gélatine sucrée et glycérinée, il développe des gaz.
	»	Coccus sphériques en diplocoques ou en courtes chaînes.	»	Saprophyte.	»

Tableau résumant les caractères les plus import

DÉSIGNATION DES ESPÈCES.	HABITAT.	CARACTÈR		
		SUR PLAQUES DE GÉLATINE.	SUR GÉLATINE.	SUR GÉLOS
M. flavus liquefaciens, p. 587......	Air et eau.	Colonies jaunâtres, liquéfiant la gélatine.	Liquéfaction rapide. Le liquide clair laisse déposer un sédiment épais.	»
M. flavus tardigradus, p. 587......	Air.	Colonies rondes, de couleur jaune de chrome foncé.	Ne liquéfie pas, se développe lentement et donne de petites colonies jaunes.	»
M. Freudenreichii, p. 606..........	Lait filant.	»	Culture blanche liquéfiant rapidement.	»
M. fulvus, p. 581..................	Excréments d'herbivores.	»	»	»
M. fuscus, p. 581..................	Eau.	»	Culture brunâtre liquéfiant.	»
M. giganteus urethræ, p. 540.	Urètre.	Ne pousse pas.	Ne pousse pas.	Culture transparente.
M. gonorrheæ, p. 518..............	Pus blennorragique ; dans les globules de pus et les cellules épithéliales.	»	Ramollit la gelée à 22°.	Sur gélose- colonies c transparentes pect luisant, à
			Petites colonies blanches, ne liquéfiant pas.	Colonies tr rentes.
M. de la gourme du cheval, p. 562..	Cheval gourmeux.	»		
M. griseus non liquefaciens, p. 597..	Viandes putréfiées.	»	Petites colonies grises, ne liquéfiant pas.	Colonies gri
M. intracellularis meningitidis, p. 495.	Exsudat de méningite cérébro-spinale. Mucus rhino-pharyngien.	Pas de culture. Ne se développe qu'à 25°.	Ramollit la gelée à 22°.	Sur gélose- les cultures développent q et ont leur max en 48 heures. nies rondes parentes.
M. lactericeus, p. 582............	Bouche.	Colonies rougeâtres.	Petite culture rouge-viande. Ne liquéfie pas.	Culture muq rouge-chair.
M. lacteus faviformis, p. 537......	Mucus vaginal normal et pus de bartholinite.	Petites colonies grises, à surface offrant une apparence aréolée.	Ne liquéfie pas. En strie, il forme des plaques d'un blanc de lait.	Bande blanc à bords lobés
M. luteus, p. 586..................	Air.	»	Ne liquéfie pas.	»
M. de la mammite contagieuse de la vache, p. 551..................	Glande mammaire et lait, dans la mammite chronique contagieuse de la vache.	Petites colonies rondes granuleuses, jaunâtres.	Ne liquéfie pas. Mince pellicule à la surface et léger trouble dans le canal.	Le long de l petites coloni des translucid peuvent confl une mince pe blanche.

…cipales espèces du genre *MICROCOCCUS*.

…RRE.	EN BOUILLON.	CARACTÈRES DES ÉLÉMENTS.	COLORATION A LA MÉTHODE DE GRAM.	ACTION BIOLOGIQUE.	OBSERVATIONS PARTICULIÈRES.
	»	Gros coccus réunis par deux ou en petits amas.	»	Saprophyte.	»
	»	Cellules sphériques de 1,5 μ.	»	»	»
…me.	»	Coccus de 2 μ et plus.	»	Le lait devient acide, puis filant, se coagule.	»
…uqueu-…s, qui …un re-…inu.	»	»	»	Saprophyte.	La matière colorante ne change ni par les acides ni par les alcalis.
…brune …	»	»	»	»	»
	Dépôt floconneux.	Longs streptocoques.	»	Saprophyte.	»
	»	Coccus ovoïdes asymétriques, de 0,5 μ de grandeur moyenne, en diplocoques, le plus souvent intracellulaires.	Négative.	Les cultures fraîches sont virulentes, mais elles s'atténuent rapidement.	»
	Flocons blancs, liquide clair.	Chaînettes souvent longues.	Positive.	Pathogène.	Coagule le *lait.*
…ulture	Trouble et dépôt blanc.	Gros diplocoques.	Positive.	»	Ferment ammoniacal de l'urée.
…ès pe-	En bouillon-ascite, trouble, homogène.	Coccus asymétriques en diplocoques, intracellulaires.	Négative.	Pathogène ; les cultures perdent vite leur virulence.	Croît peu à 25°, bien à 37°.
…nâtre.	Trouble et dépôt visqueux rouge chair.	Coccus isolés ou en diplocoques.	Positive.	Saprophyte.	Pigment rose.
…olonies	Développement très rapide. Flocons denses et compacts.	Diplocoques de 2,2 μ à 2,5 μ réunis souvent en chaînes à mouvements ondulatoires lents.	Positive.	N'est pas pathogène.	Les diplocoques ont une tendance à s'aligner dans les préparations de cultures. Ne se décolore pas par la méthode de Gram.
…ombées …ron.	»	Coccus elliptiques de 1 μ de long.	»	Saprophyte.	»
	Forme de très longues chaînes en 24 heures à 35°. Le liquide reste limpide, il laisse déposer un sédiment très léger.	Coccus ronds de 1 μ réunis en chapelets sinueux.	Négative, mais irrégulièrement.	Pathogène pour la vache et la chèvre.	Il produit rapidement de l'acide lactique dans le bouillon et le lait.

Tableau résumant les caractères les plus impor

DÉSIGNATION DES ESPÈCES.	HABITAT.	CARACTÈ		
		SUR PLAQUES DE GÉLATINE.	SUR GÉLATINE.	SUR GÉLO
M. de la mammite gangreneuse de la brebis, p. 554	Mamelle dans la mammite gangreneuse des brebis laitières.	Colonies à centre brunâtre entouré d'une auréole de liquéfaction.	Liquéfie dès le deuxième jour.	Pellicule d'abord l, puis jaunâtre
M. melitensis, p. 540	Malades atteints de fièvre de Malte.	Ne croit qu'à partir de 22°.	A 22°, mince culture blanche.	Petites c transparente bande blanc
M. mirabilis, p. 604	Eau d'égout.	Colonies avec fins tractus, sans liquéfaction.	Culture filamenteuse. Ne liquéfie pas.	Culture f teuse.
M. nacraceus, p. 602	Eau.	Colonies irisées, non liquéfiantes.	Culture nacrée. Ne liquéfie pas.	Culture b tre nacrée.
M. de la nécrose progressive du tissu conjonctif de la souris, p. 564	Gangrène déterminée chez la souris par inoculation de sang putréfié.	»	»	»
M. neoformans, p. 546	Tumeurs.	»	Culture blanche. Liquéfie.	Culture b tre.
M. oblongus, p. 595	Isolé de la bière.	»	»	»
M. ochroleucus, p. 536	Isolé de l'urine.	Petites colonies gris jaunâtre, liquéfiant lentement.	Ramollit la gélatine après avoir donné une mince membrane jaune-soufre au centre, blanchâtre aux bords.	Blanc sal stries jaunes
M. Pasteuri, p. 469	Salive normale et crachats rouillés de la pneumonie fibrineuse, sang, exsudats, etc.	Colonies rondes d'un blanc grisâtre croissant lentement.	Ne liquéfie pas. Culture blanche en clou ne se développant que vers 23°.	Gouttelette lantes, hyal 35°.
M. persicus, p. 583	Intestin d'oiseaux.	Colonies jaunâtres.	Culture rose. Liquéfie lentement.	Culture carmin.
M. plumosus, p. 603	Eau, fumier.	Colonies avec prolongements, ne liquéfiant pas.	Culture plumeuse. Ne liquéfie pas.	»
M. polypus, p. 601	Air.	Colonies à bras polypiformes.	Culture à bras. Ne liquéfie pas.	Culture épaisse.
M. prodigiosus, p. 581	Air.	Disques rosés qui s'enfoncent dans la gélatine qu'ils liquéfient.	Liquéfie rapidement. Liquide très trouble rougeâtre ; dépôt rose rouge.	Larges d'un rouge- souvent à ref talliques.
M. de la pyémie du lapin, p. 564	Eau de viande putréfiée.	»	»	»
M. pyogenes, p. 455	Pus, sang, etc.	Petites colonies discoïdes transparentes, dont le développement s'arrête vite.	Ne liquéfie pas. Colonie muqueuse blanche, assez épaisse.	Petits m blancs à 35°

...cipales espèces du genre *MICROCOCCUS*.

...TERRE.	EN BOUILLON.	CARACTÈRES DES ÉLÉMENTS.	COLORATION À LA MÉTHODE DE GRAM.	ACTION BIOLOGIQUE.	OBSERVATIONS PARTICULIÈRES.
...he gris ...stonnés, ...u à peu	Trouble en 24 h.	Très petits coccus de 0,2 μ isolés ou en amas, jamais en chaînes.	Positive.	Pathogène. Les cultures fraîches, injectées dans le trayon d'une brebis, reproduisent la maladie.	Produit de l'acide lactique dans le lait et le bouillon.
...ien.	Trouble uniforme très lent.	Très petits coccus de 0,1 μ.	Négative.	Pathogène.	»
...lture vi-	Flocons, liquide clair.	Longues chaînes.	»	Saprophyte.	»
...anc sale,	»	Diplocoques.	»	Saprophyte.	»
	»	Cellules rondes de 0,05 μ formant de longues chaînes sinueuses.	»	Occasionne chez les souris une gangrène à marche rapide, amenant la mort en trois jours.	»
	»	Coccus mobiles.	Positive.	»	»
	Se cultive très bien dans les solutions sucrées; il y forme en 24 heures un voile velouté fragile.	Cellules de 1 μ à 2 μ réunies en longs chapelets flexueux.	»	Produit de l'acide gluconique aux dépens du glucose.	Aérobie.
...aune.	Le lait a sa surface colorée en jaune après 5 ou 6 jours.	Coccus sphériques de 0,5 μ à 0,8 μ de diamètre, en diplocoques ou petites chaînes mobiles.	»	Matière colorante jaune, soluble dans l'alcool.	Aérobie. Les vieilles cultures exhalent une odeur sulfureuse pénétrante.
...gétation.	Très léger nuage dans les vieilles cultures.	Coccus ovoïdes de 1 μ à 1,5 μ, lancéolés, entourés d'une capsule qui fait défaut dans les cultures.	Positive.	Pathogène. La virulence des cultures se perd rapidement.	Aérobie, facultativement anaérobie.
	Trouble léger. Dépôt carmin.	Coccus de 1,2 μ isolés ou en diplocoques.	»	Saprophyte.	Pigment rose.
...uqueuse ...ltre.	»	Coccus de 0,8 μ, en amas.	»	Saprophyte.	»
	»	Coccus de 1 μ.	»	Saprophyte.	»
...uqueuse ...uge-sang métalli-	»	Cellules sphériques ou ovales de 0,5 μ à 1 μ. Obscurément mobiles.	Négative.	Saprophyte.	Les cultures dégagent une odeur de triméthylamine.
	»	Coccus ronds de 0,5 μ.	»	Pathogène pour le lapin.	Infiltration purulente au point d'inoculation, abcès métastatiques dans les organes.
...lture ap- ...se déve- ...urface.	Piqueté floconneux grisâtre; le liquide reste clair.	Coccus sphériques, de 0,8 μ à 1 μ; en chaînettes.	Positive; se décolore parfois.	Pathogène; les cultures perdent vite leur virulence.	»

Tableau résumant les caractères les plus impo

DÉSIGNATION DES ESPÈCES.	HABITAT.	CARACT		
		SUR PLAQUE DE GÉLATINE.	SUR GÉLATINE.	SUR GÉ
M. pyogenes albus, p. 450..........	Pus.	Colonies blanchâtres liquéfiant la gelatine.	Liquéfie rapidement ; liquide laiteux et dépôt blanc.	Large blanc grisât
M. pyogenes aureus, p. 441........	Pus.	Petites colonies rondes, gris jaune, qui liquéfient rapidement.	Liquéfie rapidement ; liquide trouble et dépôt jaune d'or.	Bande épa beau jaune
M. pyogenes citreus, p. 451........	Pus.	»	Liquéfie ; liquide trouble, dépôt jaunâtre.	Mêmes c que *M. p aureus*, ma tion jau foncé.
M. pyosepticus, p. 454..............	Tumeur cancéreuse non ulcérée.	»	Liquéfie comme *M. pyogenes albus*, mais moins rapidement.	»
M. radiatus, p. 600................	Eau.	Colonies blanches, parfois à reflets verdâtres, avec des prolongements qui les font ressembler à des étoiles de mer.	En piqûre, il se forme des prolongements radiaires. Liquéfaction lente.	»
M. rosettaceus, p. 603..............	Eau.	Gouttelettes gris jaunâtre brillantes. Ne liquéfie pas.	En piqûre, la culture a souvent une forme de rosette.	»
M. rosettaceus, p. 603..............	Eau.	Colonies gris jaunâtre.	Culture en rosette. Ne liquéfie pas.	Culture g
M. roseus, p. 582..................	Air.	Petits boutons rosés, souvent mamelonnés, qui forment de larges disques.	Culture épaisse, rosée ou de couleur claire, ramollissant très peu la surface de la gelée.	Large ba lisse.
M. rouge-cerise de List, p. 582.....	Eau.	»	»	Culture r
M. rubescens, p. 585...............	Intestin.	Colonies rose rouge non liquéfiantes.	Culture rouge. Ne liquéfie pas.	Culture ge.
M. rubiginosus, p. 583.............	Intestin d'oiseaux.	Colonies jaunâtres en rosette.	Culture blanche. Liquéfie. Liquide rougeâtre.	Culture tre.
M. salivarius pyogenes, p. 567.....	Salive.	Colonies rondes d'un blanc opaque, liquéfiant lentement.	Liquéfie lentement ; liquide et mince voile visqueux.	Bande jaune-orang
M. salivarius septicus, p. 566......	Salive dans un cas de fièvre puerpérale.	Colonies grisâtres ne liquéfiant pas.	Ne liquéfie pas. Très petites colonies blanchâtres.	»
M. de la septicémie consécutive au charbon, p. 564..................	Sang charbonneux putréfié.	»	»	»

…ncipales espèces du genre *MICROCOCCUS*.

…		CARACTÈRES DES ÉLÉMENTS.	COLORATION À LA MÉTHODE DE GRAM.	ACTION BIOLOGIQUE.	OBSERVATIONS PARTICULIÈRES.
…UR …E TERRE.	EN BOUILLON.				
…ine blan-… , mince.	Liquide trouble, dépôt blanchâtre.	Cellules rondes ayant en moyenne 1 μ de diamètre.	Positive.	Pathogène.	»
mince. …r. tardive.	Trouble rapide à 20°; dépôt jaunâtre, liquide trouble.	Coccus sphériques, de 0,9 μ à 1,5 μ, isolés ou en petits amas.	Positive.	Pathogène.	Les cultures développent une odeur de lait aigre ou de colle de farine fermentée.
	Grumeaux visqueux blanchâtres.	»	Positive.	Pathogène; tue les cobayes, lapins et pigeons, pas les chiens.	Chez le lapin, il se forme au point d'inoculation un énorme œdème gélatineux.
	»	Coccus sphériques de 1 μ en moyenne; isolés ou en petits amas.	Positive.	Saprophyte.	»
épaisse. …n.	»	Coccus peu mobiles, de 0,8 μ à 1 μ, en petits amas ou en courtes chaînes.	»	Saprophyte.	»
	Mince pellicule à la surface.	Coccus de 0.7 à 1 μ.	»	Saprophyte.	»
jaune ver-	Trouble et voile grisâtre.	Coccus de 0,7 μ à 1 μ, en amas.	Positiv .	Saprophyte.	»
	»	Gros coccus ovoïdes, mesurant 1,4 μ de long, réunis souvent en diplocoques.	»	Saprophyte.	»
rouge.	»	Coccus de 0.2 μ à 0,3 μ, en diplocoques ou en chaînes.	»	Saprophyte.	»
rouge	Trouble et sédiment visqueux.	Diplocoques.	Positive.	Saprophyte.	Pigment rose rouge.
	Trouble et voile blanc jaunâtre.	Coccus ou diplocoques.	»	Saprophyte.	Pigment rouge vineux soluble dans l'eau.
	Trouble en deux heures, dépôt blanc.	»	Positive.	Pathogène; produit une suppuration localisée.	Ne se décolore pas par la méthode de Gram.
	»	Coccus ronds, isolés, par deux ou en amas.	Positive.	Pathogène.	Inoculé sous la peau, tue les lapins, souris, cobayes, en quatre à six jours.
	»	Coccus ronds, de 1 μ à 2 μ, disposés en longs chapelets; légèrement mobiles.	»	Pathogène. Le chien, la poule et le cobaye sont réfractaires. La virulence des cultures s'atténue vite.	L'inoculation détermine une septicémie chez le lapin; mort de 18 à 48 heures.

Tableau résumant les caractères les plus impo

DÉSIGNATION DES ESPÈCES.	HABITAT.	CARACT		
		SUR PLAQUES DE GÉLATINE.	SUR GÉLATINE.	SUR GÉ
M. de la septicémie du lapin, p. 565.	Sang de bœuf putréfié.	»	»	Culture visqueuse.
M. Sornthalii, p. 606	Lait.	Disques muqueux d'un blanc sale.	Culture muqueuse. Ne liquéfie pas.	Culture grisâtre.
M. stellatus, p. 601	Eau.	Colonie en étoile, non liquéfiante.	ulture blanche. Ne liquéfie pas.	»
M. subcarne is, p. 583	Intestin d'oiseaux.	Colonies roses.	Culture jaune rougeâtre. Liquéfie très lentement.	Culture chair.
M. subflavus, p. 535	Mucus vaginal et lochies. Urine et pus d'abcès au sein. Pus blennorragique.	Colonies gris jaunâtre, granuleuses vers le 5e jour.	Liquéfie après avoir donné des colonies d'un jaune d'ocre.	Dévelo rapide ; jaune d'oc
M. sublilacinus, p. 585	Intestin.	Colonies blanches liquéfiantes.	Culture blanche liquéfiant rapidement.	Culture puis lilas.
M. de la suppuration progressive du lapin, p. 564	Sang putréfié.	»	»	»
M. tetragenus, p. 490	Crachats et contenu des cavernes des phtisiques. Pus.	Petites colonies bombées d'un blanc brillant.	Ne liquéfie pas. Culture blanchâtre.	Colonies blanches la strie.
M. ureæ, p. 589	Air ; se trouve en abondance dans l'urine ammoniacale.	»	Ne liquéfie pas. Cultures aplaties d'un blanc de porcelaine brillant.	»
M. vermiformis, p. 604	Eau.	Colonies avec stries radiaires, liquéfiantes.	Liquéfaction rapide.	»
M. versicolor, p. 588	Air.	Grandes colonies visqueuses verdâtres, à reflets nacrés.	Ne liquéfie pas. Pellicule jaunâtre, nacrée.	»
M. viridis flavescens, p. 452	Lymphe de pustules de varicelle.	»	Ne liquéfie pas. Colonie verdâtre en clou.	Culture à croissan
M. viscosus, p. 596	Vin et bière filants.	»	»	»
M. viticulosus, p. 603	Air et eau.	Colonies formant de petits amas de filaments contournés en vrille.	Ne liquéfie pas. Pellicule blanche d'où partent de longs filaments en vrille se répandant dans la gelée.	»

ncipales espèces du genre *MICROCOCCUS*.

…R …E TERRE.	EN BOUILLON.	CARACTÈRES DES ÉLÉMENTS.	COLORATION À LA MÉTHODE DE GRAM.	ACTION BIOLOGIQUE.	OBSERVATIONS PARTICULIÈRES.
	Trouble et voile épais.	Coccus ovoïdes mesurant 0,8 μ à 1 μ.	Négative.	Pathogène pour le lapin, chez qui il cause une septicémie.	D'après Davaine, les poules sont réfractaires.
	»	Coccus de 0,7 μ.	»	Fait fermenter le sucre de lait avec dégagement de gaz.	»
muqueuse	»	Coccus isolés.	»	Saprophyte.	»
	Trouble et sédiment rosé.	Coccus ou diplocoques.	»	Saprophyte.	Pigment rose.
ppement éciable.	Trouble à la 15e heure à 35°; dépôt jaunâtre.	Diplocoques de 2 μ à 2,6 μ, jusque 3 μ sur bouillon. Assez mobiles.	Positive.	L'inoculation au lapin cause un abcès.	»
blanc-lilas	Trouble.	Diplocoques.	Positive.	Saprophyte.	Pigment lilas rosé.
	»	Coccus de 0,15 μ.	»	Détermine chez le lapin une suppuration qui tend à s'étendre.	Tue le lapin en 12 jours. Se trouve dans les parois de l'abcès.
	Dépôt très épais.	Coccus sphériques de 1 μ, en tétrades.	Positive.	Pathogène; tue les souris blanches et les cobayes.	Les souris de champs et de maisons, les lapins, sont peu sensibles ou réfractaires. Reste coloré par la méthode de Gram.
	»	Coccus sphériques de 1 μ à 1,5 μ, souvent en longues chaînes.	»	Agent de la fermentation ammoniacale de l'urine.	Les vieilles cultures dégagent une odeur de colle de farine qui fermente.
jaune sale.	»	Coccus en chaînes à mouvements lents.	»	Saprophyte.	»
	»	Coccus petits, en diplocoques ou en petits amas.	»	Saprophyte.	»
	»	»	»	Inoffensif pour les animaux.	»
	Le liquide se trouble rapidement et devient visqueux.	Coccus en longues chaînes flexueuses.	»	Produit la fermentation visqueuse de certains liquides.	Les cultures dégagent une odeur fade.
membrane sale.	»	Coccus ovales, de 1,2 μ en gros amas.	«	Saprophyte.	Serait un ferment actif du glucose.

2e GENRE. — SARCINA Goodsir.

Créé par Goodsir pour la *Sarcina ventriculi*, ce genre renferme des Bactéries à éléments d'ordinaire sphériques, parfois ovoïdes, qui, par suite de divisions s'opérant successivement dans trois plans différents perpendiculaires les uns aux autres, forment des colonies massives, cubiques, ressemblant à des paquets à faces carrées ou rectangulaires (fig. 236). Les creux qui existent entre chacun des éléments sur les faces et les côtés de ces masses ajoutent encore à la similitude, simulant grossièrement les empreintes des liens ayant servi à ficeler les paquets. Le processus de la division, qui d'une cellule forme une colonie massive, est encore peu connu. D'après Hauser (1), les phénomènes se passeraient de la façon suivante : une cellule prête à se diviser se partage en deux parties égales et forme ainsi un diplocoque ; chacun des deux éléments du couple se divise alors à son tour suivant sa longueur ; on obtient ainsi une tétrade dont les quatre éléments se partagent à leur tour par un seul plan, qui coupe en deux la plaquette qu'ils constituent par leur assemblage ; c'est ainsi que se forme la masse cubique la plus simple, constituée par huit cellules. Après croissance, les éléments du cube se multiplient d'une façon semblable et donnent des masses de plus en plus considérables. Typiquement, les cellules sont rarement isolées ; elles sont au contraire accolées par une matière unissante assez solide. Dans certaines conditions cependant, qui semblent dépendre surtout du milieu où vit l'espèce, elles présentent une grande tendance à se séparer dès la division. Les paquets cubiques n'existent plus ; les tétrades sont rares ; on n'observe plus que les coccus isolés les uns des autres ou réunis par deux en diplocoques. Si ce n'étaient les commémoratifs qui ramènent à la forme typique précédemment observée, rien ne pourrait faire distinguer ces *Sarcines* de *Micrococcus*. Parfois, cependant, un simple changement de milieu nutritif peut faire réapparaître la forme normale. Les genres *Sarcina* et *Micrococcus* présentent du reste de grandes affinités et de nombreux points de contact ;

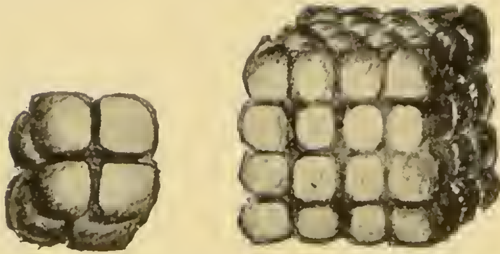


Fig. 236. — Schéma de la formation de paquets de Sarcines.

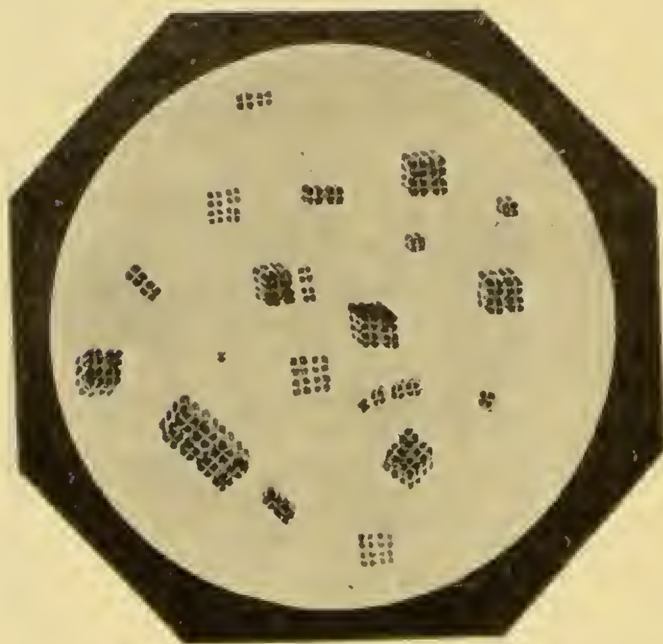


Fig. 237. — Sarcines. 700/1.

(1) Hauser, Ueber Lungensarcine (*Wirchow's Arch. für path. Anat.*, 1887, p. 127).

c'est également l'avis de Stubenrath (1). La *Sarcina ventriculi*, observée dans les vomissements ou dans le contenu stomacal, montre des paquets assez gros, formés d'un grand nombre de cellules, 16, 32 ou 64 par exemple. Cultivée sur milieux solides, elle ne forme plus que les diplocoques et très peu de tétrades. Une parcelle de cette dernière culture, transportée dans du bouillon à l'étuve, donne rapidement à la surface du milieu nutritif une pellicule écailleuse brunâtre, de la partie inférieure de laquelle se détachent des petits flocons bruns qui nagent dans le liquide; la pellicule et les flocons contiennent de ces amas de forme caractéristique, d'autant plus gros que la culture est plus âgée. Le contraire peut du reste avoir lieu. Des colonies ne contenant que des cellules rondes, isolées, sont prises pour des cultures de *Micrococcus* et classées comme telles; la forme de *Sarcine* n'apparaît que plus tard, dans des cultures obtenues avec les premières.

Dans la cavité buccale et l'intestin des poulets, on trouve souvent des Sarcines dont les paquets cubiques de huit éléments présentent un arrangement très régulier en chaînes, de véritables *Streptosarcines*.

Maurea (2) a observé des mouvements bien nets chez une espèce qu'il dénomme *Sarcina mobilis*; c'est peut-être plutôt un *Micrococcus* en tétrade qu'une véritable Sarcine. Sames (3) décrit aussi une Sarcine mobile.

La séparation des Sarcines mobiles dans un genre à part, le genre *Planosarcina*, proposée par Migula, est loin de s'imposer.

Pendant longtemps la division a été considérée comme le seul mode de reproduction des espèces de ce genre. Hauser, dans son mémoire précité, a décrit, avec toutes les apparences de vraisemblance, la formation des spores dans une *Sarcine* qu'il a obtenue des crachats d'un phtisique. Certaines cellules isolées augmentent de volume; leur protoplasma cellulaire devient trouble. La partie centrale la plus considérable de ce contenu se contracte et acquiert une plus grande réfringence, pendant qu'il se forme à sa périphérie une sorte de membrane sombre. Il se constitue ainsi, au bout de peu de temps, un corpuscule arrondi, brillant, très réfringent, mesurant de 0,6 μ à 0,8 μ de diamètre; la membrane de la cellule mère devient diffluente et peut se dissocier en mettant cette spore en liberté. Les spores se forment surtout dans les tétrades et dans les paquets cubiques; on peut en trouver alors soit dans toutes les cellules d'un amas, ou seulement dans une partie, parfois à des degrés de développement différents. Ces corpuscules possèdent les caractères habituels des spores de Bactéries. Elles résistent en particulier à la chaleur beaucoup plus que les cellules végétatives; des cultures en contenant, portées à 100° dans la vapeur d'eau, ont encore pu être fertiles. La double coloration réussit avec elles, mais il est nécessaire de passer la lamelle jusqu'à trente ou quarante fois dans la flamme pour permettre à la matière colorante de pénétrer. On obtient alors, avec la double coloration à la fuchsine et au bleu de méthylène, des spores colorées en rouge rose et les débris des cellules mères qui les entourent

(1) Stubenrath, Das Genus Sarcina in morphologischer, biologischer und pathologischer Beziehung mit besonderer Berücksichtigung der Magensarcine. Munich, Lehmann, 1897.

(2) Maurea, Ueber eine bewegliche Sarcine (*Centralbl. für Bakt.*, XI, 1892, p. 228).

(3) Sames, Eine bewegliche Sarcine (*Centralbl. für Bakt.*, 2te Abth., IV, 1898, p. 664).

teints en bleu pâle. Depuis, la formation de spores a été décrite chez quelques autres espèces.

Plusieurs observateurs attribuent à la membrane cellulaire des Sarcines la propriété de bleuir par l'acide sulfurique et l'iode ou par le chloro-iodure de zinc, ce qui indiquerait que cette partie est formée de substance cellulosique. Je n'ai pu vérifier le fait que pour la *Sarcina aurea*. Encore la coloration ne s'observe que sur quelques rares masses isolées, sans que rien puisse expliquer cette différence entre des amas cellulaires en tout semblables. Cette coloration, qui est violet-pourpre avec le chloro-iodure de zinc, est très fugitive; elle se forme lentement, puis disparaît après quelques secondes. De plus, je n'ai pu observer la réaction qu'avec des cultures sur pomme de terre. Elle semble d'ordinaire bien localisée aux cellules, les colorant fortement; d'autres fois, elle paraît diffuser dans le milieu ambiant, indiquant peut-être la présence de matière amylacée soluble, produite par l'action des diastases sécrétées par les cellules.

On ne connaît jusqu'ici qu'un assez petit nombre d'espèces du genre *Sarcina*; plusieurs formes, habitant les eaux douces, qui avaient été décrites comme telles, sont des Algues appartenant au genre *Merismopedia* ou à des genres voisins.

Lœwenberg (1) a signalé une *Sarcine pathogène* pour les animaux d'expérience; elle sera décrite plus loin sous le nom de *Sarcina Lœwenbergii*. C'est la première Sarcine qui ait montré des propriétés pathogènes manifestes; quelques autres espèces en possèdent également.

SARCINA VENTRICULI Goodsir.

Cette espèce est fréquente dans le contenu stomacal de l'homme et des animaux; on l'observe spécialement dans les vomissements; elle abonde d'ordinaire quand la fermentation des produits accumulés dans l'estomac est favorisée par leur stagnation occasionnée par un état de souffrance de l'organe. Elle a été découverte par Goodsir (2) et étudiée peu après par Lebert et Ch. Robin (3). Elle se trouve parfois en quantité considérable dans le contenu stomacal; Richter (4) a signalé un cas d'obstruction complète du pylore suivie de mort, qu'il a attribué aux amas de Sarcines. Virchow (5) dit en avoir observé dans un abcès gangreneux du poumon ; on en a rencontré plusieurs fois depuis dans cet organe qui diffèrent beaucoup de la *Sarcina ventriculi*. J.-H. Bennett (6) et Hasse (7) en ont trouvé dans les selles; Heller (8), dans du mucus diarrhéique.

(1) Lœwenberg, Sur une Sarcine pathogène (*Ann. de l'Inst. Pasteur*, XIII, 1899, p. 358).

(2) Goodsir, History of a case in which a fluid periodically ejected from the Stomach contained vegetable Organismus of an undescribed form (*Edinburgh med. and surg. Journ.*, t. LVII, 1842, p. 130).

(3) Ch. Robin, Histoire naturelle des végétaux parasites, p. 332. Paris, J.-B. Baillière, 1853.

(4) Richter, Verstopfung des Pylorus durch Sarcina ventriculi (*Virchow's Arch.*, CVII, 1887, p. 198).

(5) Virchow, Die Sarcina (*Virchow's Arch.*, I, 1847, p. 264).

(6) J.-H. Bennett, Lectures on clinical Medicin. Edinburgh, 1851.

(7) Hasse, Beobachtungen über die Sarcina ventriculi, 1847

(8) Heller, *Griesinger's Arch.*, 1848, et *Arch. für phys. und path. Chemie*, 1852.

Des Sarcines sont fréquentes dans l'estomac du lapin et du singe ; elles sont très probablement identiques à l'espèce de l'homme. Falkenheim (1) a décrit les principaux caractères de culture de cette espèce et permis ainsi de la différencier facilement des espèces voisines. L'estomac de l'homme renferme du reste souvent plusieurs espèces de Sarcines; Stubenrath (2) avoue qu'il trouve difficile la distinction d'une véritable *Sarcina ventriculi*.

Telles qu'on les observe dans le contenu stomacal, les cellules de la *Sarcine de l'estomac* sont rondes ou légèrement ovales, incolores ou faiblement teintées en jaune. Elles mesurent environ 2,5 μ de long et sont la plupart du temps réunies en petites masses cubiques, à coins ronds (fig. 238), formées d'un nombre plus ou moins considérable de cellules, toujours en multiple de quatre à cause du mode tout spécial de division, 8-16-32-64. Robin donne comme dimensions des plus grosses masses 55 μ de longueur et 20 μ de largeur. Ces masses ont une consistance coriace, élastique. Elles reviennent sur elles-mêmes après une compression. Elles ont, dans les vomissements, une légère teinte brune, sont très transparentes et assez peu réfringentes; sous une assez forte pression ou en faisant agir des alcalis concentrés, les paquets se désagrègent d'abord en masses plus petites, puis en simples éléments.

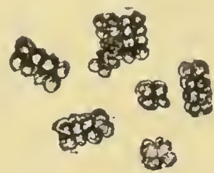


Fig. 238. — *Sarcina ventriculi.*

Les cultures prospèrent sur tous les milieux employés; elles se développent mieux sur les milieux neutres que sur ceux légèrement acides.

Sur *plaques de gélatine*, au bout de trente-six à quarante-huit heures, il s'est formé de petites colonies rondes, un peu proéminentes, de couleur jaune, dont la croissance s'arrête après peu de temps. A l'examen microscopique, on y trouve des coccus sphériques, incolores, de 1,5 μ de diamètre, réunis la plupart du temps en diplocoques et parfois en tétrades, mais ne constituant jamais les paquets cubiques caractéristiques. Ces colonies ne liquéfient pas la gélatine.

En *piqûre* ou en *strie* dans un tube de *gélatine*, la culture s'étend rapidement et couvre toute la surface libre de la gelée. Si l'on colore la gélatine avec quelques gouttes de teinture de tournesol bleue avant de l'ensemencer, elle devient tout à fait rouge en quarante-huit heures. Il se produit donc un acide, probablement de l'acide lactique.

Sur *pomme de terre*, il se développe, en vingt-quatre heures, le long de la strie d'inoculation, de petites colonies rondes, incolores, qui deviennent plus tard jaunes; elles atteignent 1 millimètre de large et sont alors couleur jaune de chrome.

Sur *sérum*, cette espèce donne de petites colonies rondes, blanches ou faiblement jaunâtres; le sérum reste solide.

Dans aucune de ces cultures on n'obtient l'arrangement des cellules en paquets, si spécial aux espèces du genre *Sarcina*; d'après Falkenheim, on l'observe toujours en cultivant dans une infusion de foin cette Sarcine, prise indifféremment dans le contenu stomacal ou dans une des cultures précédentes. Il se forme à la surface de ce milieu, en vingt-quatre heures, une mince pellicule brunâtre, sèche, écailleuse, et au fond

(1) Falkenheim, Ueber Sarcina (*Arch. für experim. Path.*, XIX, 1885, p. 389).
(2) Stubenrath, *loc. cit.*, p. 626.

du vase de culture un dépôt floconneux brun. Dans la pellicule et le dépôt, on trouve de nombreux paquets de Sarcines. Le développement se fait bien mieux si l'on ajoute à l'infusion de foin 1 à 3 p. 100 de glucose.

L'espèce n'attaquerait ni la fibrine, ni le blanc d'œuf, très peu les hydrocarbonés (1).

On n'a aucune donnée expérimentale sur l'action de la *Sarcine de l'estomac* sur l'organisme.

SARCINA LŒWENBERGII

C'est une des rares Sarcines pathogènes connues. Lœwenberg (2) l'a rencontrée dans les fosses nasales d'une malade atteinte depuis longtemps de punaisie, chez laquelle les caractères cliniques de la maladie différaient radicalement de ceux de l'ozène vrai. Le mucus nasal renfermait de très nombreux paquets de Sarcines.

Dans le mucus nasal, les paquets de Sarcines sont souvent réunis par des filaments fins, pouvant se ramifier. Ces microbes sont immobiles. Ils se colorent facilement aux couleurs d'aniline et restent colorés par la méthode de Gram.

Les cultures s'obtiennent facilement sur les milieux habituels ; elles poussent à la température ordinaire et mieux à l'étuve.

Sur *gélatine*, en plaques, les colonies forment de petites taches blanches, laiteuses, bien opaques ; elles deviennent un peu jaunâtres en vieillissant. En piqûre, il se forme à la surface un petit disque blanc et jusqu'au fond du trajet un chapelet de colonies rondes, blanches.

La gélatine n'est jamais liquéfiée.

Sur *gélose*, en strie, on obtient un enduit blanc laiteux, luisant, jaunissant un peu à la longue.

Dans les *milieux liquides* ordinaires, cette Sarcine forme un dépôt blanc, cohérent ; le liquide reste clair.

Elle pousse bien dans le *lait*, qui reste alcalin et ne se coagule pas.

Sur *pomme de terre*, elle donne une épaisse culture blanche.

Les cultures ne dégagent jamais d'odeur.

Elle ne pousse pas sur les *milieux acides*.

Dans les cultures sur milieux solides, le microbe perd vite son groupement caractéristique ; bientôt, on ne trouve que des coccus, en amas ou en courtes chaînes. En réensemençant sur milieux liquides, la forme Sarcine reparaît.

Ce microbe se cultive bien en anaérobie, sans dégager ni gaz ni odeur.

Il est nettement *pathogène* pour les souris blanches, les cobayes et les lapins.

En inoculation sous-cutanée, les souris meurent en vingt-quatre heures, sans lésions appréciables. La Sarcine se retrouve dans le sang.

En inoculation intrapéritonéale, les cobayes et les lapins meurent souvent en vingt-quatre heures. On trouve à l'autopsie une péritonite intense avec de nombreuses Sarcines dans l'exsudat. Le sang du cœur donne des cultures du microbe.

(1) Coyon, Contribution à l'étude biochimique de la *Sarcina ventriculi* (*Soc. de Biol.*, 16 décembre 1899).

(2) Lœwenberg, Une Sarcine pathogène (*Ann. de l'Inst. Pasteur*, XIII, 1899, p. 358).

La virulence s'atténue assez vite.

La fétidité de l'haleine a disparu chez la malade en même temps que la Sarcine, sans qu'on puisse établir d'autre relation.

La Sarcine pathogène, décrite par Schlaefrig(1), rencontrée également dans la sécrétion d'un ozène, est probablement la même.

Galli-Valerio (2) a rencontré une Sarcine pathogène dans les mucosités blanches, filantes, mais ne dégageant aucune odeur, qui se trouvaient dans les fosses nasales d'un malade atteint de pemphigus du nez et de la bouche,

Les cultures, faciles et abondantes, rappellent celles de *Sarcina Lœwenbergii*, mais paraissent toutefois plus visqueuses. Dans les mucosités et dans les cultures, les paquets de Sarcine émettent des prolongements filamenteux, qui forment une sorte de réseau à mailles irrégulières, où les Sarcines occupent certains nœuds. Les Sarcines restent colorées par la méthode de Gram, alors que ces tractus se décolorent. En colorant à l'éosine, on voit souvent une auréole rose autour des paquets.

Les éléments des paquets ont un diamètre de 1,5 μ à 2 μ. Il n'y a pas d'indice de mobilité.

Le microbe ne fait fermenter ni le glucose, ni le lactose. Il ne produit jamais d'indol.

Cette Sarcine est pathogène pour les cobayes, et surtout pour les rats. En inoculation sous-cutanée, on obtient généralement des abcès; en inoculation intrapéritonéale, une péritonite; ou bien on observe des symptômes de septicémie, avec pleurésie, méningite, etc. Le lapin est réfractaire aux inoculations sous-cutanées. La virulence se conserve longtemps dans les produits.

SARCINA NAGANOI.

Nagano (3) l'a rencontrée dans le pus d'un abcès de l'ovaire.

Les éléments sont de grosseur moyenne et réunis en paquets caractéristiques ou en diplocoques. Dans le pus, ils se montrent en diplocoques asymétriques, très semblables à ceux du *Gonocoque*. Ces éléments sont toujours immobiles. Ils se colorent facilement aux méthodes ordinaires et se *décolorent* par la méthode de Gram; on peut cependant voir la couleur rester fixe sur de petits grains chromatiques, assez nombreux dans quelques éléments.

Les cultures se font très bien à 37° et lentement à 24°. L'espèce ne croît qu'en présence d'air.

Sur *plaques de gélatine*, le développement est très lent. Après huit jours, on trouve de petites colonies rondes, blanches, qui liquéfient lentement.

Sur *gélatine*, en piqûre, on observe, après dix jours à 24°, une liqué-

(1) SCHLAEFRIG, Ueber eine pathogene Sarcine (*Wiener klin. Wochenschr.*, 1901, n° 42).

(2) GALLI-VALERIO, Recherches expérimentales sur une Sarcine pathogène (*Centralbl. für Bakt.*, 1te Abth., Originale, XLII, 1908, p. 177).

(3) NAGANO, Ueber eine neue Sarcina, die im Eiter gonokokkenähnliche Degenerations formen zeigt (*Centralbl. für Bakt.*, XXXII, 1902, Originale, p. 327).

faction avec bulle de gaz. La liquéfaction continue lentement à se faire.

Sur *gélose*, en vingt-quatre heures à 37°, il se forme une épaisse colonie grisâtre. Le développement est le même sur *sérum*.

Dans le *bouillon*, il se produit un léger trouble, puis le liquide s'éclaircit.

On n'observe pas de développement sur *pomme de terre* et dans le *lait*.

Les cultures tuent les souris en inoculation intrapéritonéale et sous-cutanée; elles déterminent des abcès chez le lapin et rien chez le cobaye.

SARCINA LUTEA Schroeter (1).

C'est une Bactérie de l'air qui vient fréquemment contaminer les cultures. Dans les premières cultures, on trouve des diplocoques, des tétrades et des paquets caractéristiques, dont les éléments ont à peu près 1 μ de diamètre.

Sur *plaques de gélatine*, elle forme, à la surface, de petites colonies discoïdes, jaunes. Ces colonies sont lentes à croître; après une huitaine de jours, elles ont donné de petits monticules hémisphériques ou un peu aplatis, à bords droits ou légèrement sinueux, d'une couleur jaune-citron légèrement verdâtre, qui s'enfoncent peu à peu dans la gélatine; il ne se produit pas de liquéfaction nette, mais la culture se trouve au fond d'une dépression très marquée.

Sur *gélatine*, en piqûre, on obtient, après une huitaine de jours, à la surface une masse jaune-canari clair qui couvre toute la partie libre. La gelée est liquéfiée très lentement; la colonie tombe au fond sous forme d'un dépôt jaune, et le liquide reste tout à fait clair.

Sur *gélose*, le développement est plus rapide, surtout à l'étuve; il se produit une large bande jaune clair, à reflets verdâtres, à surface lisse et brillante, de consistance crémeuse. La culture sur *pomme de terre* a le même aspect, mais est beaucoup plus lente à venir. Le *bouillon* se trouble à peine et montre un très minime dépôt granuleux, jaune sale.

Dans toutes ces cultures, la forme en paquets a disparu. Les cellules sont libres ou unies en diplocoques et présentent souvent un mouvement assez vif.

La matière colorante est insoluble dans l'eau, soluble dans l'alcool, l'éther, le chloroforme, la benzine.

Cette espèce a été signalée sur la peau de l'homme; c'est elle probablement que Bordoni (2) a isolée. Sa présence en cet endroit n'a rien qui doive étonner, vu sa grande dissémination dans l'air. Elle est aussi commune dans l'eau.

La *Sarcina flava* en est très voisine.

SARCINA AURANTIACA Koch.

C'est aussi une espèce très commune dans l'air et l'eau. Sur *plaques*

(1) Schroeter, Kryptogamenflora von Schlesien. Pilze, 1886.

(2) Bordoni, Ueber die biologische Eigenschafften der normalen Hautmikrophyten (*Fortschr. der Med.*, 1886, n° 5).

de gélatine, les colonies sont des petits disques d'un jaune orangé terne qui s'accroissent assez rapidement en largeur et donnent une sorte de pellicule ferme, résistante, s'enlevant en bloc, d'une coloration jaune ocracé, à bords relevés et comme gaufrés. Cette colonie s'enfonce peu à peu dans la gélatine, qu'elle liquéfie lentement, puis flotte à la surface de la partie liquéfiée. Ces cultures peuvent atteindre une largeur assez grande, $0^{cm},5$ à 1 centimètre.

Sur *gélatine*, en piqûre, elle croît lentement en liquéfiant le milieu. Le liquide est clair et est recouvert d'une pellicule jaune terne.

Sur *gélose*, il se développe, le long de la strie, une large colonie membraneuse, plissée, de couleur jaune d'ocre.

Sur *pomme de terre*, la croissance est lente et se limite à la strie d'inoculation, qu'elle recouvre d'une mince bande jaune d'or.

Le *lait* est coagulé.

Les colonies de cultures sur plaques sont souvent formées de gros coccus de 2 μ de longueur, isolés ou en diplocoques; les masses cubiques y sont rares. Elles s'observent au contraire dans les cultures sur milieux solides.

SARCINA ALBA (1).

Elle est commune dans les eaux. Les éléments arrondis mesurent 0,88 μ de diamètre et sont immobiles ; certains contiendraient des spores.

Sur *plaques de gélatine*, les colonies incluses dans la gelée sont de petites sphères grisâtres. Celles qui arrivent à la surface forment un petit bouton blanc grisâtre. Elles liquéfient la gélatine, mais très lentement.

Sur *gélatine*, en piqûre, il se développe une semblable culture à la surface et presque rien dans le canal. La liquéfaction, très lente, ne commence que vers le quatorzième jour.

Sur *gélose*, on obtient une mince colonie blanchâtre, lisse.

Le *bouillon* se trouble très peu, puis s'éclaircit en abandonnant un mince dépôt floconneux.

SARCINA PULMONUM Hauser.

Beaucoup d'observateurs ont signalé la présence de Sarcines dans les produits d'expectoration pathologiques, ou dans le tissu lui-même du poumon. Virchow en a trouvé dans la gangrène pulmonaire, Bamberger dans les crachats fétides d'une dilatation des bronches, Friedreich dans un infarctus hémorragique du poumon, Cohnheim dans des cas de tuberculose chronique, Heimer et Nauwerck dans des cavernes; Fischer en a rencontré en grand nombre dans plusieurs affections du poumon et de la bouche. Aucun de ces auteurs cependant n'avait songé à les différencier de la *Sarcina ventriculi*; tous pensaient avoir affaire à cette espèce. Hauser (2), plus récemment, a pu isoler une Sarcine des crachats d'un phtisique et se convaincre, par une étude consciencieuse, qu'elle était spécifiquement différente de la *Sarcine de*

(1) Adametz, Die Bacterien der Trink und Nutzwässer, 1888.
(2) Hauser, Ueber Lugensarcine (*Deutsche Arch. für klin. Med.*, 1887, p. 127).

l'estomac. Il a donné des détails très intéressants sur ces cultures, qui s'obtiennent facilement sur les milieux habituels.

Sur *plaques de gélatine*, on voit se former, au bout de trois jours, de petits points blanchâtres dans la gélatine; leur croissance est longue, ils ne s'élargissent guère que lorsqu'ils atteignent la surface. Ils y forment de petites colonies ovales très bombées, colorées en brun pâle à la lumière transmise. A un plus fort grossissement, ces colonies semblent formées de gros grains qui, surtout à la périphérie, sont disposés en cercles concentriques.

Sur *gélatine*, en piqûre, la culture est bien apparente en vingt-quatre heures. Elle donne en peu de temps, à la surface, une petite colonie ronde, gris-perle, qui en grandissant prend des bords sinueux et un éclat humide, un peu brillant. Dans le canal de la piqûre, on n'observe que de petites colonies punctiformes. La gélatine n'est jamais liquéfiée.

Sur *pomme de terre*, le développement est peu abondant; il s'y forme une culture brunâtre, peu étendue. De même dans le *bouillon*, où se produit un petit dépôt grisâtre, un peu visqueux; le liquide ne se trouble pas et n'offre pas de voile à la surface.

Dans les jeunes colonies, on trouve des diplocoques, des tétrades ou des petits cubes constitués par huit cellules. Dans les colonies plus développées, il y en a seize et trente-deux. Les cellules mesurent de 1 μ à 1,5 μ. D'après Hauser, leur division s'opérerait de la façon suivante :

Une cellule se divisant en deux donnerait un diplocoque, dont les éléments, se partageant suivant la longueur du couple, produiraient une tétrade : la tétrade formerait un petit cube par suite de la bipartition de ses quatre éléments par un même plan. Ces cellules, isolées ou réunies, ne manifestent aucune motilité. De véritables spores endogènes prendraient naissance dans des éléments isolés ou agglomérés; leur formation a été décrite précédemment (p. 627). Les spores résistent à une forte chaleur; des cultures en contenant ayant été portées à 110° se sont montrées fertiles.

Cette espèce ne paraît avoir aucune propriété pathogène; administrée avec les aliments à des lapins, elle ne leur a occasionné aucun trouble : il existait cependant des tétrades à spores vivantes dans les selles; l'estomac n'en contenait pas. Elle décompose énergiquement l'urée, comme une autre Sarcine, trop peu connue, que Leube (1) a isolée de l'urine.

SARCINA AUREA Macé.

Cette belle espèce a été isolée dans mon laboratoire de l'exsudat du poumon, recueilli à l'autopsie avec les précautions voulues, chez un individu mort d'une pneumonie bâtarde compliquée de pleurésie purulente.

Sur *gélatine* en piqûre, les cultures se développent vite, la liquéfaction commence au second jour; le tube est entièrement liquéfié du sixième au huitième jour. Au-dessus du liquide complètement clair, s'est formée une pellicule épaisse, d'un beau jaune d'or, très friable; au fond

(1) Leube, Ueber die ammoniakalische Harngährung (*Virchow's Arch.*, C, 1880, p. 40).

est un dépôt blanchâtre peu abondant. La pellicule se brise en morceaux irréguliers à la moindre agitation et tombe au fond du vase. La liquéfaction devient plus lente au fur et à mesure que les cultures vieillissent; en cinquième culture, elle n'apparaît guère avant le sixième jour.

Sur *gélose*, vers 35°, il se produit une bande large et épaisse, à surface verruqueuse, colorée en jaune d'or brillant. Après plusieurs générations, la teinte pâlit et devient jaune pâle.

La *pomme de terre* est un très bon terrain de culture pour cette espèce; on y obtient, en inoculant la surface par plusieurs stries, d'épaisses bandes d'une teinte jaune d'or brillant, à surface plus lisse que celle des cultures sur gélose. Dans les vieilles cultures, le centre prend une coloration jaune blafarde.

Dans le *bouillon*, la culture est bien particulière. Il se forme au fond du vase un dépôt jaune d'or, de coloration plus claire que celle des cultures sur milieux solides, très cohérent, tout à fait adhérent au verre, s'élevant à 1 centimètre environ du fond sur les parois du vase et présentant son bord supérieur libre régulièrement festonné. Le liquide ne se trouble pas et ne montre pas de voile.

Toutes ces cultures renferment l'espèce disposée en paquets caractéristiques de grandeur variable. Ces masses cubiques sont formées d'éléments un peu ovoïdes, mesurant de 1 μ à 1,1 μ de long, que l'on peut trouver aussi, mais rarement, isolés, en diplocoques ou en tétrades. Ces éléments, isolés ou réunis en masses, possèdent un mouvement oscillatoire très vif. Certains donnent, avec l'acide sulfurique et l'iode, une coloration bleu violet, qui indiquerait chez eux la présence de matière amylacée ou cellulosique. Le pigment est soluble dans l'alcool absolu et donne une liqueur d'un beau jaune d'or.

SARCINA MOBILIS Maurea.

Maurea (1) l'a isolée d'un liquide d'ascite conservé depuis longtemps : elle venait probablement de l'air.

Les éléments ont 1,5 μ de diamètre; ils sont le plus souvent réunis en diplocoques et en tétrades et présentent un mouvement très net de trépidation et même d'ondulation.

Ils se colorent bien aux couleurs d'aniline et restent colorés par la méthode de Gram.

Le microbe se développe bien sur les milieux habituels, mais seulement à la température ordinaire et pas du tout à l'étuve.

Sur *plaques de gélatine*, on

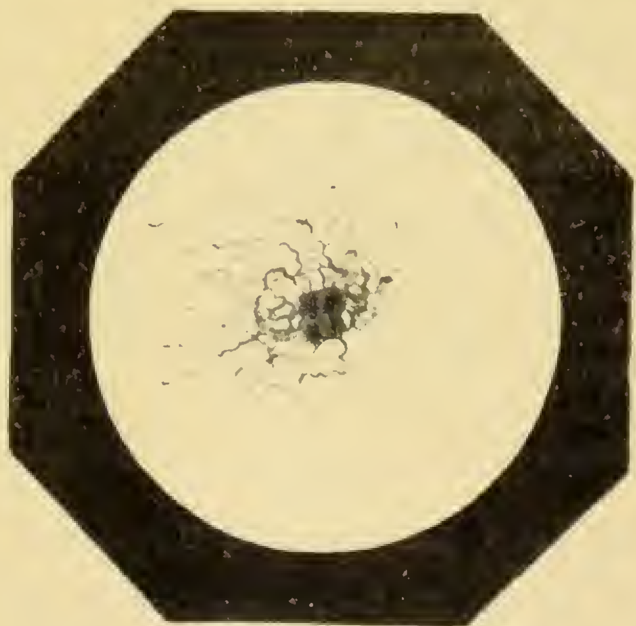


Fig. 239. — *Sarcina agilis* avec cils (d'après Zettnow).

(1) Maurea, Ueber eine bewegliche Sarcine (*Centralbl. für Bakt.*, XI, 1892, p. 228).

obtient vers le cinquième jour de petites colonies lenticulaires blanchâtres, qui commencent à liquéfier vers le septième ou huitième jour et se colorent alors en rouge-brique. En piqûre, le développement se fait surtout à la surface ; c'est un petit disque rouge-brique qui liquéfie lentement le milieu.

Sur *gélose*, il se forme une culture blanchâtre qui se colore peu à peu comme précédemment.

Sur *pomme de terre*, pas de développement.

Dans le *bouillon*, il se forme un trouble rapide ; puis le liquide s'éclaircit en laissant déposer un sédiment jaune rougeâtre.

Le microbe se développe bien dans le *lait* sans produire de coagulation.

Sames (1) a rencontré une autre Sarcine mobile dans le purin. Elle reste également colorée par la méthode de Gram et montre de nombreux longs cils par les méthodes de coloration spéciales (fig. 239).

Elle donne sur gélose des colonies blanc grisâtre et sur pomme de terre des taches jaunâtres, brunissant à la longue.

Sur gélatine, elle forme une colonie blanc grisâtre qui ne liquéfie jamais.

Elle n'a montré aucune propriété pathogène.

SARCINA CEREVISIÆ Lintner.

(*Pediococcus cerevisiæ.*)

Lintner (2) l'a isolé de bières malades ; Adametz (3) la signale dans l'eau.

Le diamètre des éléments est très variable ; de 0,5 μ dans la bière, il atteint jusqu'à 3 μ dans les milieux riches en azote. Ces éléments sont réunis en tétrades ou en petits paquets, rarement en diplocoques ou isolés.

Sur *plaques de gélatine*, cette espèce donne de petites colonies incolores sphériques, à bords lisses. Avec l'âge, elles s'étendent en une couche mince qui donne lieu à un beau jeu de lumière ; le centre prend une teinte jaunâtre.

Sur *gélatine*, en piqûre, il se développe une culture blanche, lisse. La gélatine n'est pas liquéfiée.

Sur *gélose*, il se forme une culture grisâtre, un peu irisée.

Sur *pomme de terre*, on obtient de petites colonies granuleuses, jaunâtres, montrant beaucoup de formes d'involution.

Cette espèce ne croît pas dans le bouillon de malt stérilisé ; elle ne se développe que lentement dans le moût de bière faiblement alcalin.

Dans les *bouillons* et les liquides peptonisés, elle forme un voile à la surface. Le liquide devient faiblement acide ; l'acidité est due probablement à de l'acide lactique.

La bière envahie devient verdâtre, de saveur désagréable. Les dégâts causés peuvent être considérables. C'est une véritable infection (4).

(1) Sames, Eine bewegliche Sarcine (*Centralbl. für Bakt.*, 2te Abth., IV, 1898, p. 664).
(2) Lintner, Die Sarcina-organismen der Gährungsgewerbe. Inaug. Dissent., Berlin, 1888.
(3) Adametz, Die Bakterien der Trink und Nutzwässer, Vienne, 1888.
(4) Kupfer, Die Sarcina-infektion (*Wochenschr. für Brauerei*, 1896, p. 32).

SARCINA UREÆ.

Hartge (1) a étudié une Sarcine qu'il a isolée d'une urine de diabétique.

Elle ne se développe qu'à la température du corps et au mieux sur de la gélose contenant de l'urine et dans l'urine stérilisée, ou les solutions de glucose. Elle ne croît pas dans les milieux alcalins, mais seulement dans ceux qui sont neutres ou légèrement acides.

Miquel (2) décrit sous le nom d'*Urosarcina Hansenii* une Sarcine qui serait un ferment assez énergique de l'urée. Elle est commune dans l'eau et les poussières.

Les cellules sont de grosseur variable, parfois de forme irrégulière, disposées en tétrades ou en cubes.

Elle donne sur gélatine de petites colonies blanches qui deviennent jaunes en quarante-huit heures. La gélatine n'est pas liquéfiée.

En culture dans le bouillon, le liquide reste clair; il apparaît sur les parois du vase un petit dépôt granuleux, légèrement adhérent.

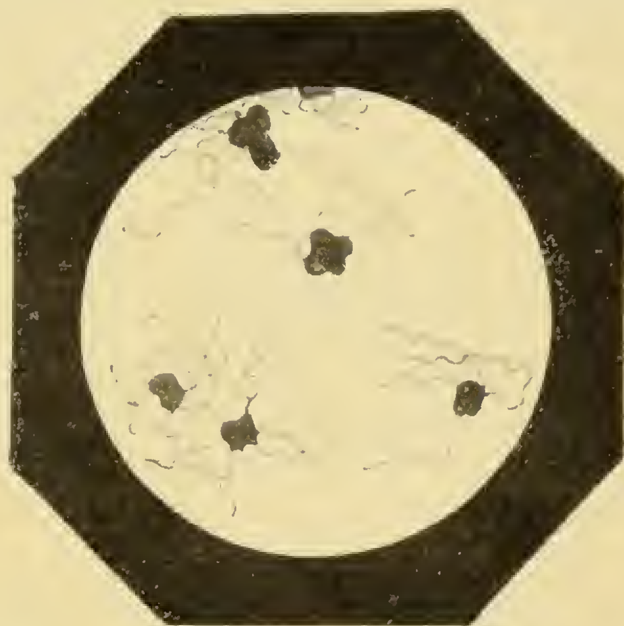


Fig. 240. — *Sarcina ureæ* avec cils (d'après Zettnow).

Beijerinck (3) décrit sous le nom de *Planosarcina ureæ* une Sarcine très mobile, qu'il a isolée de l'urine et de la terre de jardin. Les éléments isolés ou les masses cubiques montrent, par les méthodes de coloration spéciales, de longs cils épars sur tout le corps (fig. 240).

Cette Sarcine formerait des spores résistantes ; aussi la pasteurisation est-elle un bon moyen de l'isoler; elle supporte 80° pendant dix minutes.

Sur plaques de gélatine, les colonies apparaissent en deux jours. Celles de la surface sont arrondies, grisâtres, un peu transparentes ; celles de la profondeur sont lobées. Il ne se produirait pas de liquéfaction.

D'après Ellis (4), en piqûre dans la gélatine, le développement serait très lent et ne commencerait qu'après dix jours; la colonie, blanchâtre, liquéfierait alors la gélatine, mais lentement.

Sur gélose, en moins d'un jour, la surface est recouverte d'un grand nombre de petits points blanchâtres, qui confluent rapidement en une couche grisâtre.

(1) Hartge, Külturversuche mit der Harnsarcine (*Petersb. med. Wochenschr.*, 1890, n° 22).

(2) Miquel, Étude sur la fermentation ammoniacale et sur les ferments de l'urée (*Ann. de micr.*, 1993).

(3) Beijerinck, Anhaüfungsversuche mit Ureumbakterien. Ureumspaltung durch Urease und durch Katabolismus (*Centralbl. für Bakt.*, 2e Abth., VII, 1901, p. 33).

(4) Ellis, Untersuchungen über Sarcina, Streptococcus und Spirillum (*Centralbl. für Bakt.*, 1re Abth., XXXIII, Originale, 1902 et 1903, p. 1, 81 et 161).

Dans le bouillon et l'urine, le développement est rapide. Il ne s'y forme pas de spores, qui sont abondantes dans les autres cultures.

Il n'y aurait pas de développement avec l'urée seule. Le microbe formerait cependant beaucoup d'uréase dans les cultures sur les autres milieux, sans qu'il puisse transformer de grandes quantités d'urée.

SARCINA INTESTINALIS Zopf.

Zopf (1) l'a rencontrée dans l'intestin de poulets et de dindons, principalement dans le cæcum. Elle forme presque toujours des colonies disposées sur une seule couche en tablettes carrées ou rectangulaires, ou de petits cubes de huit éléments, mais jamais de gros paquets.

Les Sarcines sont fréquentes dans le contenu intestinal, dans le mucus de la bouche, du nez, sur les amygdales.

SARCINA ROSEA Schroeter.

Trouvée dans les marais, entre des Algues. Ce sont des cellules sphériques, ayant jusqu'à 2 μ de diamètre, réunies en petits paquets cubiques, arrondis aux angles, pouvant mesurer 8 μ de long.

C'est probablement cette Sarcine que Menge (2) a rencontrée dans du lait qui avait pris une coloration rouge très prononcée. Ce lait montrait une grande quantité de paquets de Sarcines avec leur forme caractéristique.

Sur *plaques de gélatine*, on aperçoit, après quarante-huit heures, de très petites colonies transparentes, rondes, qui, à un faible grossissement, paraissent incolores ou légèrement jaunâtres. Les colonies qui gagnent la surface s'étendent un peu, puis deviennent rosées et liquéfient la gelée autour d'elles. A ce moment, elles affectent souvent la forme d'une rosette; au milieu se trouve une petite masse rouge, entourée d'anneaux concentriques de même couleur, mais de teintes variées.

Sur *gélatine*, en piqûre, il se forme à la surface une colonie rose rouge, mince, large, et dans la piqûre une minime culture qui va jusqu'au fond. Vers le quatrième jour, la liquéfaction commence et n'atteint les bords du tube qu'après six ou sept semaines.

Sur *gélose*, la culture, assez abondante, reste longtemps blanche et ne se colore que dans son milieu.

Le *bouillon* ensemencé reste clair; il se développe, sur le fond du vase, de petites colonies punctiformes blanches.

Sur *pomme de terre*, les cultures sont moyennement épaisses et d'un beau rouge.

Le *lait* stérilisé se colore rapidement en rouge intense, mais ne paraît subir aucun changement. La couche de crème, qui se sépare par le repos, montre de nombreuses stries rouges ; le liquide sous-jacent est rougeâtre.

Le pigment est insoluble dans l'eau et l'alcool, même bouillants.

Les acides étendus ne le modifient pas à froid, mais le détruisent à chaud. L'ammoniaque et les lessives alcalines se comportent comme

(1) Zopf, Die Spaltpilze, p. 55.

(2) Menge, Ueber roth Milch (*Centralbl. für Bakt.*, VI, 1889, p. 596).

les acides étendus. Ce pigment est également insoluble dans l'éther, le sulfure de carbone, le chloroforme, la benzine.

Ce microbe ne paraît être pathogène pour aucun des animaux d'expérience.

SARCINA PALUDOSA Schroeter.

D'après Schroeter (1), elle serait fréquente dans les eaux de déchet des fabriques de sucre.

Les éléments sont sphériques, incolores, très réfringents, mesurant jusqu'à 2 μ de diamètre. Ils sont réunis en familles plus grosses et moins régulières que celles de la *Sarcine de l'estomac*, et présentant les coins et les angles de séparation des cellules plus arrondis.

Gruber (2) a donné une intéressante revision du genre *Sarcina*, en décrivant plusieurs espèces nouvelles ; il a établi la clef dichotomique suivante qui peut rendre de bons services pour la détermination :

I. Espèces dont les cultures sur milieux solides ont une couleur blanche.	
1. *Formant des paquets typiques sur les milieux solides et liquides.*	
a. Liquéfiant la gélatine.	
α. Colonies rondes en cultures sur plaques.	
A. Liquéfiant lentement la gélatine.....	*Sarcina alba* Zimmermann.
B. Liquéfiant rapidement la gélatine...	*Sarcina alutacea* Gruber.
β. Colonies irrégulières en culture sur plaques.	
Liquéfiant rapidement la gélatine......	*Sarcina incana* Gruber.
b. Ne liquéfiant pas la gélatine.	
α. Colonies rondes en cultures sur plaques..	*Sarcina pulchra* Henrici.
β. Colonies irrégulières en cultures sur plaques.	
A. Développement bien net à la surface.	*Sarcina pulmonum* Virchow
B. Pas de développement à la surface.	
Troublant l'infusion de foin........	*Sarcina lactea* Gruber.
Ne troublant pas l'infusion de foin.	*Sarcina vermicularis* Grub.
	Sarcina minuta de Bary.
2. *Ne formant de paquets typiques que dans les milieux liquides.*	
a. Liquéfiant la gélatine.	
α. Ne formant de paquets que dans l'infusion de foin..................................	*Sarcina candida* Reinke.
β. Ne formant de paquets que dans le bouillon.	*Sarcina albida* Gruber.
b. Ne liquéfiant pas la gélatine.	
α. Ne croissant pas sur gélatine............	*Sarcina Welkeri* Roman.
β. Croissant sur gélatine.	
A. Formant des paquets dans le bouillon.	*Sarcina nivea* Henrici.
B. Formant des paquets dans l'infusion de foin.................................	*Sarcina ventriculi* Goodsir.

(1) Schroeter, Kryptogamenflora von Schlesien.

(2) Gruber, Die Arten der Gattung Sarcina (*Arb. aus dem Bakt. Inst. der techn. Hochschule zu Karlsruhe*, I, 1895, 2, p. 239).

II. Espèces formant de la matière colorante.

§. *Matière colorante jaune.*

1. *Formant des paquets typiques sur les milieux solides et liquides.*

a. Liquéfiant la gélatine.

α. Colonies rondes en cultures sur plaques.

A. Croissance lente, liquéfaction rapide de la gélatine .... *Sarcina flava* de Bary.

B. Liquéfaction de la gélatine lente à se produire.

Le bouillon reste clair; des paquets se forment dans tous les milieux... *Sarcina superba* Henrici.

Le bouillon reste clair; il ne se forme de paquets que dans la gélatine et le bouillon.......................... *Sarcina olens* Henrici.

Le bouillon se trouble au début, puis s'éclaircit; il se forme des paquets dans tous les milieux............. *Sarcina orescens* Gruber.

β. Colonies irrégulières en cultures sur plaques.

Formant des paquets dans tous les milieux............................ *Sarcina liquefaciens* Frankland.

γ. La liquéfaction de la gélatine devient très lente à partir de la cinquième culture; le bouillon reste clair avec un dépôt jaune d'or.................................. *Sarcina aurea* Macé.

b. Ne liquéfiant pas la gélatine.

α. Colonies rondes en cultures sur plaques.

A. Croissance lente .... *Sarcina lutea* Schroeter.

B. Formant des paquets typiques dans tous les milieux; troublant le bouillon et l'infusion de foin................. *Sarcina livida* Gruber.

C. Formant des tétrades dans le bouillon, des paquets dans l'infusion de foin; ne troublant ni le bouillon ni l'infusion de foin.......................... *Sarcina meliflava* Gruber.

β. Colonies irrégulières en cultures sur plaques.

A. Formant des paquets typiques dans tous les milieux.

Croissance rapide sur gélatine, lente sur la gélose.............. *Sarcina luteola* Gruber.

Culture vermiforme sur gélatine en strie .... *Sarcina vermiformis* Grub.

Matière colorante d'un jaune-citron franc............................ *Sarcina citrina* Gruber.

Colonies se réduisant en poudre jaune .... *Sarcina striata* Gruber.

Montrant un développement bien net en surface .... *Sarcina marginata* Gruber.

B. Ne formant de paquets que dans les milieux liquides.

Dégageant du gaz................. *Sarcina gazoformans* Grub.

2. *Ne formant de paquets que dans les milieux liquides.*

a. Colonies rondes en cultures sur plaques; liquéfiant la gélatine.

Matière colorante d'un jaune soufre brillant; liquéfaction lente de la gélatine. *Sarcina flavescens* Henrici.

Matière colorante jaune orangé : liquéfaction rapide de la gélatine............... *Sarcina aurantiaca* Koch.

b. Colonies irrégulières en cultures sur plaques.

Ne liquéfiant pas la gélatine.

Bouillon trouble au début, clair plus tard. *Sarcina sulfurea* Henrici.

Bouillon et infusion de foin restant toujours clairs .... *Sarcina velutina* Gruber.

c. Colonies irrégulières au début, rondes plus tard. Bouillon à trouble léger et constant ; infusion de foin toujours claire............... *Sarcina intermedia* Gruber.

§§. *Matière colorante rose.*

1. Formant des paquets typiques dans les milieux liquides et solides : ne liquéfiant pas la gélatine ; colonies rondes en cultures sur plaques.

Des paquets dans le bouillon, des coccus et des diplocoques dans l'infusion de foin, des paquets sur les milieux solides ; pigment rose clair.................................. *Sarcina carnea* Gruber.

Des coccus dans toutes les cultures, à côté des paquets ; matière colorante du rose pâle au rouge de viande .... *Sarcina incarnata* Gruber.

2. Ne formant de paquets typiques que dans les liquides.

a. Liquéfiant la gélatine .... *Sarcina rosea* Schroeter.

b. Ne liquéfiant pas la gélatine.............. *Sarcina persicina* Gruber.

§§§. *Matière colorante brune.*

1. Des paquets typiques sur les milieux solides et liquides ; ne liquéfiant pas la gélatine.......... *Sarcina fusca* Gruber.

2. Ne formant de paquets que dans les liquides : ne liquéfiant pas la gélatine. .... *Sarcina fuscescens* de Bary.

3e genre. — LEUCONOSTOC Van Tieghem.

Les cellules rondes, incolores, très petites, sont unies en chapelets flexueux, entourés d'une gaine épaisse de gelée de consistance ferme, cartilagineuse. Ces gaines forment, par leur accolement en certain nombre, des masses irrégulières, lobées, présentant des circonvolutions à la surface et acquérant la dureté du cartilage. Dans les chapelets, il se forme des spores, provenant de la transformation directe de certaines des cellules, qui deviennent grandes et prennent une membrane plus épaisse et un contenu plus réfringent. Ces spores sont séparées les unes des autres ; elles se trouvent comprises dans le chapelet ou à ses extrémités.

Les *Leuconostoc* ne sont peut-être que des Streptocoques munis d'une épaisse gaine de gelée consistante.

LEUCONOSTOC MESENTEROIDES Cienkowsky.

Les Zooglées de cette espèce forment des masses gélatineuses mesurant de la grosseur d'une noisette à celle du poing, à surface mamelonnée, de consistance ferme et élastique. On les observe fréquemment dans les sucreries, sur les appareils qui servent à l'obtention des jus sucrés de betteraves et, plus rarement, dans les sirops cuits. Leur apparence et leur consistance leur font donner en France le nom vulgaire de *gomme de sucrerie*, et, en Allemagne, celui de *frai de grenouille* (*Froschlaich*).

Le développement en a été étudié simultanément par Cienkowski (1), et, beaucoup plus complètement, par Van Tieghem (2), puis par Liesenberg et Zopf (3).

Les cellules végétatives sont sphériques, mesurant de 0,8 μ à 1,2 μ; celles qui se préparent à se diviser sont plus longues et de forme ovale ou en courts bâtonnets à extrémités arrondies. Les cellules (fig. 241, *4*,



Fig. 241. — *Leuconostoc mesenteroides* : *1*, spores isolées; *2*, spores germant; *3*, *4*, *5*, *6*, formation des chapelets entourés de leur gaine; *7*, chapelets pelotonnés; *8*, coupe d'une Zooglée ayant terminé son accroissement; *9*, coupe d'une Zooglée âgée; les spores se sont formées dans les chapelets; *10*, petite Zooglée de grandeur naturelle. Les figures 1-9 sont grossies 520 fois (d'après Van Tieghem).

5, *6*, *7*) sont réunies en nombre variable, en chapelets dont les grains restent séparés par une courte distance tant que le développement est actif; lorsque le développement est terminé, les grains se touchent et sont alors régulièrement sphériques (fig. 241, *9*). Chacun de ces chapelets est entouré d'une gaine gélatineuse mesurant de 6 μ à 20 μ, six à vingt fois environ le diamètre d'un grain. Ces boudins gélatineux se recourbent et se pelotonnent, en se serrant fortement (fig. 241, *6*, *7*), et donnent un tubercule blanchâtre, transparent, compact, à surface mamelonnée, vermiculée (fig. 241, *10*). Ce tubercule s'accroît et prend une consistance

(1) Cienkowski, Ueber die Gallertbildungen der Zuckerrübensaftes. Charcow. 1878.

(2) Van Tieghem, Sur la gomme de sucrerie (*Ann. des sc. nat.*, *Bot.*, VII, 6e série, 1878).

(3) Liesenberg et Zopf, Ueber den sogenannten Froschlaichpilz (Leuconostoc) der europaischen Rübenzucker, und der javanischen Rohrzuckerfabriken (*Beitr. zür Phys. und Morph. niederer Organismen de Zopf*, Heft 1, 1892).

assez ferme pour qu'on puisse y pratiquer facilement des coupes au rasoir. Par suite de la pression que les tubes gélatineux exercent les uns sur les autres, la masse interne prend l'aspect d'un pseudo-parenchyme (fig. 241, *8*).

Quand le liquide nutritif est épuisé, la Zooglée cesse de s'accroître et commence à dépérir. C'est à ce moment que se forment les spores. Certaines cellules des chapelets (fig. 241, *9*) grossissent tout en restant sphériques, gagnent une membrane épaisse et un contenu très réfringent. Ce sont de véritables spores durables, qui mesurent de 1,8 μ à 2 μ. Ces spores peuvent se trouver aux extrémités des chapelets ou être intercalées aux autres cellules; elles sont toujours séparées les unes des autres par un certain nombre de cellules végétatives. Les conditions mauvaises continuant à agir, la masse gélatineuse se dissocie et les différents éléments de chapelets sont mis en liberté dans le liquide. Souvent les cellules végétatives, ne trouvant pas les conditions de vie qui leur conviennent, meurent; les spores résistent aux causes diverses de destruction et gardent même longtemps leur puissance germinative. Si la spore est transportée dans un milieu nutritif nouveau, elle germe immédiatement. La couche externe dure de la membrane se brise, la couche moyenne se gonfle beaucoup et forme une épaisse enveloppe de gelée autour de la couche externe, mince et transparente, qui entoure le protoplasma central (fig. 241, *1*, *2*). Ce coccus s'allonge, donne un court bâtonnet qui s'étrangle en son milieu et se scinde bientôt en deux éléments (fig. 241, *3*). C'est le commencement des chapelets que nous connaissons.

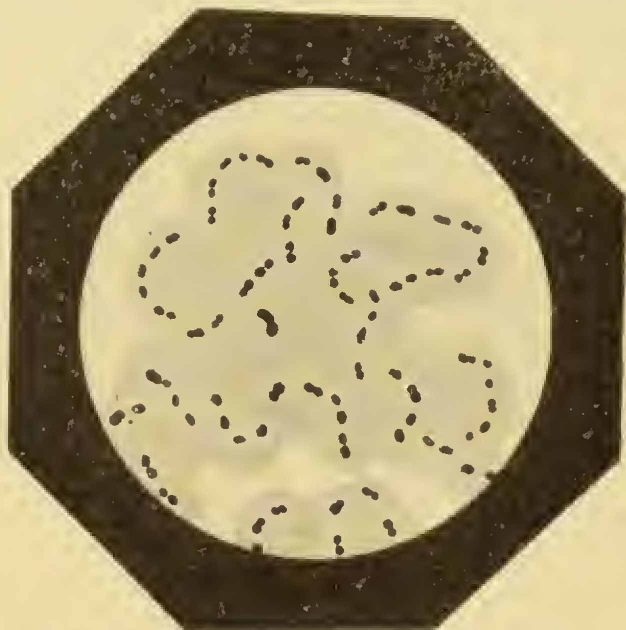


Fig. 242. — *Leuconostoc mesenteroides*. Coloration à l'érythrosine (d'après Zettnow).

Dans des jus sucrés, la végétation peut être extrêmement rapide, si de bonnes conditions de température et d'aération se trouvent réunies. D'après Durin (1), 50 hectolitres de dissolution de mélasses à 10 p. 100 de sucre ont été transformés en une masse gélatineuse compacte douze heures après avoir été versés dans une cuve où du jus de betteraves avait séjourné pendant quelques jours. On comprend que cette Bactérie puisse devenir un ennemi redoutable pour les sucreries. Le *Leuconostoc mesenteroides* intervertit le sucre à l'aide d'invertine qu'il sécrète, puis se nourrit du sucre interverti qu'il brûle complètement. On le cultive très bien dans une solution de sucre de canne à laquelle on ajoute de petites quantités de nitrate et de phosphate alcalins.

Le nom de *fermentation cellulosique* du sucre, qui a été employé, est impropre. Il n'y a d'abord pas fermentation, comme nous venons de le

(1) Durin, Sur la transformation du sucre cristallisable en produits cellulosiques (*Ann. des sc. nat.*, *Bot.*, 6e série, III, 1877, p. 266).

voir; ensuite la matière gélatineuse produite par le développement de cet être vivant n'est pas de la cellulose; elle n'en possède aucunement les propriétés; entre autres, elle ne se dissout pas dans le liquide cupro-ammoniacal. Ce n'est pas non plus une substance albuminoïde; l'iode, qui jaunit les cellules de chapelets, est sans action sur elle. C'est une matière ternaire qui paraît être voisine de la dextrine, à laquelle Scheibler (1) donne le nom de *dextrane*, en la rapprochant de la viscose de la fermentation visqueuse.

Liesenberg et Zopf ont pu obtenir des cultures pures de cette espèce, en maintenant pendant un quart d'heure à la température de 75° des Zooglées dans la partie gélatineuse desquelles se trouvait en abondance une courte Bactérie en bâtonnets. Grâce à une épaisse enveloppe, le *Leuconostoc* supporte, sans être atteint, une température de 80°, même 86°, pendant quelques minutes, jusqu'à un quart d'heure. Zettnow (2) a réussi très facilement des cultures pures en lavant à plusieurs reprises, à l'eau ou au bouillon stérilisé, le produit impur; il en détache ensuite une parcelle qu'il écrase largement sur de la gélatine. Des colonies poussent isolées. Les caractères culturaux donnés par Zettnow sont les mêmes que ceux des auteurs précédents.

Sur *gélatine*, additionnée de sucre de canne, en strie, elle forme, après dix à quinze jours, une masse épaisse, blanchâtre, formée de petites sphères gélatineuses, à partie libre, transparente comme du verre, le tout ressemblant à une cristallisation en croûtes. La consistance en est au début sèche, élastique, cartilagineuse; elle devient molle plus tard.

En piqûre, dans l'intérieur de la gelée, les colonies sont sphériques, verruqueuses, ressemblant à des grains de sagou.

Sur navet ou sur betterave, on obtient d'épaisses Zooglées semblables d'aspect à la culture cartilagineuse qui vient d'être décrite (3).

Dans le bouillon ou les milieux liquides renfermant 10 p. 100 de sucre de canne et 1 p. 100 de peptone, il se forme d'épaisses Zooglées gélatineuses. Dans le bouillon peptonisé, sans sucre, le développement de la gelée est très minime ou nul.

Ludwig (4) a décrit sous le nom de *Leuconostoc Lagerheimii* une espèce qu'il a rencontrée, avec des Levures et des Moisissures, dans une sorte de maladie de la gomme des chênes. Elle ressemble beaucoup au *Leuconostoc mesenteroides* et n'en doit très probablement pas être distinguée. Les éléments ronds mesurent de 0,6 μ à 0,8 μ de diamètre; ils se colorent très facilement au violet de gentiane.

Ce *Leuconostoc* donne sur la gélatine de petites colonies sphériques ou lenticulaires presque hyalines, qui liquéfieraient le milieu. Cultivé dans des sucs de fruits, il les rend très visqueux, même gélatineux.

Koch et Hosaeus (5) ont observé une gomme de sucrerie produite par

(1) Scheibler, Recherche sur la nature du dépôt dit « frai de grenouille » (*Journ. des fabricants de sucre*, novembre et décembre 1874).

(2) Zettnow, Ueber Froschlaichfildungen in Saccharose enthaltunden Flüssigkheiten (*Zeitschr. für Hyg.*, LVII, 1907, p. 154).

(3) Zopf, Die Spaltpilze, p. 72.

(4) Ludwig, Ueber Alcoholgährung und Schleimfluss lebender Baume (*Bericht der deutschen bot. Gesellschaft*, IV, 1886).

(5) Koch et Hosaeus, Ueber einen Froschlaich der Zuckerfabriken (*Centralbl. für Bakt.*, XVI, 1894, p. 225).

une Bactérie en bâtonnets, sécrétant une longue gaine gélatineuse pédiculée; ils proposent de la nommer *Bacterium pediculatum* (Voy. fig. 5, p. 21). Glaser (1) cite son *Bacterium gelatinosum betæ* comme pouvant produire une semblable maladie des jus sucrés de betterave. Cunningham (2) donne un *Leuconostoc* comme cause d'une maladie des betteraves. Ce sont là des espèces encore imparfaitement connues.

LEUCONOSTOC HOMINIS Hlava.

Hlava (3) a décrit sous ce nom une forme de streptocoque qu'il aurait rencontrée fréquemment dans les maladies éruptives, scarlatine, rougeole, typhus exanthématique, soit dans le sang, soit dans la cavité buccale.

Dans les cultures sur milieux ordinaires, les éléments forment des diplocoques ou des chaînettes semblables à ce qu'on observe avec le *Streptocoque pyogène*. Dans les milieux renfermant du saccharose, les chaînettes sont entourées d'une épaisse gaine de matière mucilagineuse, transparente, rappelant beaucoup ce qui s'observe chez le *Leuconostoc mesenteroides*. Cette gaine est constante dans les milieux saccharosés; elle disparaît complètement dans les autres milieux.

Les éléments se *décolorent* par la méthode de Gram; la gaine se colore à la fuchsine phéniquée.

Dans le *bouillon saccharosé* à 1 ou 2 p. 100, il se forme, de douze à vingt-quatre heures à 37°, un voile membraneux blanchâtre, qui tombe après quelques jours et forme un dépôt d'abord gélatineux, plus tard presque cartilagineux. Le liquide reste toujours clair et montre une forte réaction acide, due à de l'acide lactique formé aux dépens du sucre.

Sur *gélose saccharosée*, à 37°, se développent des colonies bien spéciales, d'aspect vitreux, mamelonnées, incrustées dans le milieu par leur base. Elles gagnent en consistance avec l'âge et prennent alors un bord plus dur et brunâtre.

Sur les milieux ordinaires et même sur les milieux contenant d'autres sucres, glucose et maltose, on obtient des cultures, mais d'aspect bien différent, où les chaînettes ne montrent jamais la gaine mucilagineuse particulière.

Sur *gélose peptonisée*, il se forme de petites colonies hyalines, semblables à des gouttes de rosée, croissant peu et prenant tard une apparence blanchâtre. La gélose maltosée ne donne rien de plus.

Dans le *bouillon* ordinaire, glucose ou maltose, il se forme simplement de petits grumeaux au fond du vase.

Dans le *lait*, on observe une coagulation.

Sur *gélatine* ordinaire, la végétation est très minime et ne liquéfie pas.

Hlava l'a rencontré, chez les scarlatineux, dans le sang, sur les amyg-

(1) Glaser, Zur Gallertausscheidung in Rübensäften (*Centralbl. für Bakt.*, 2te Abth., I, p. 879).

(2) Cunningham, A bacteriale disease of the sugar beet (*Botanical Gazette*, XXVIII, 1899, p. 177).

(3) Hlava, Leuconostoc hominis und seine Rolle bei den akuten exanthematischen Krankheiten (Scharlach, Masern, Flecktyphus) (*Centralbl. für Bakt.*, XXXI, Originale, 1902, p. 263).

dales, dans les ganglions lymphatiques et dans la rate; chez des malades atteints de rougeole, dans la sécrétion nasale, le mucus buccal, le sang et sur les amygdales; dans des fausses membranes diphtériques, à côté du Bacille de Lœffler; dans un cas d'angine phlegmoneuse, sur les amygdales; dans des cas de coryza contagieux, dans la sécrétion nasale; plusieurs fois dans le tartre dentaire, dans la carie dentaire, même dans la salive normale ou sur des amygdales saines; dans le contenu stomacal chez un dysentérique, dans les selles, et dans un cas d'appendicite suppurée. Hlava admet, en outre, l'identité du *Leuconostoc hominis* avec le *Streptobacille* qu'il a signalé dans le sang des malades atteints de typhus exanthématique (1).

Ce microbe est, la plupart du temps, sans action sur les animaux, en injection intraveineuse, ou ne détermine que de petites rougeurs au point d'inoculation. Les cultures en sérum humain liquide ont paru un peu pathogènes pour des lapins malingres.

Il n'est pas possible, jusqu'ici, d'attribuer à cette espèce un rôle dans l'étiologie des affections citées.

4e GENRE. — ASCOCOCCUS Billroth.

La dénomination est de Billroth (2); c'est Cohn (3) qui en a précisé les caractères en décrivant, mieux que ne l'avait fait le premier observateur, la seule espèce connue de son temps.

Les cellules rondes, incolores, très petites des coccus sont réunies, par de la gelée peu abondante, en familles sphériques ou ovoïdes, à surface régulière ou mamelonnée, entourées d'une épaisse capsule hyaline, de consistance cartilagineuse.

Ce genre *Ascococcus* ne peut être considéré que comme une coupe provisoire. Il n'y aurait peut-être pas lieu de le séparer du type *Micrococcus*. D'un autre côté, les *Ascococcus* se rapprocheraient aussi des formes qui seront décrites plus loin comme *Ascobacterium* ou *Ascobacillus*.

ASCOCOCCUS BILLROTHII Cohn.

L'espèce a été signalée par Billroth dans l'eau de viande putréfiée; elle a été plus tard retrouvée par Cohn, se développant dans la liqueur minérale qui porte son nom.

Elle forme à la surface des liquides une peau épaisse et visqueuse d'apparence laiteuse, un peu jaunâtre, rappelant la crème qui se forme à la surface du lait cuit. Cette membrane est peu résistante; en la soulevant avec une baguette de verre, elle se brise en flocons qui se répandent dans le liquide. Elle est constituée par de nombreux éléments, présentant la disposition en familles si caractéristique. Ce sont des cellules sphériques, incolores, de très faible diamètre, formant par leur réunion un nombre considérable de petites masses rondes, ovoïdes ou elliptiques, régulières ou mamelonnées. Ces coccus sont serrés les uns

(1) Hlava, O Typhu exanthematickem (*Acad. François Joseph de Prague*, 1893, en tchèque avec résumé en français).

(2) Billroth, Coccobacteria septica. Berlin. 1874.

(3) Cohn, Untersuchungen ueber Bacterien, II (*Beitr. zur Biol. der Pflanzen*, 1er vol., 2e p., 1875, p. 151).

contre les autres et ne laissent voir entre eux que très peu de la gelée qui les unit. Les familles ont, en moyenne, de 20 μ à 60 μ de diamètre ; certaines atteignent 160 μ. Chacune d'elles est entourée d'une épaisse capsule transparente, de consistance dure, cartilagineuse, difficile à briser, même par une forte pression. Cette enveloppe ne se dissout pas dans l'ammoniaque concentrée et ne se colore pas en jaune par l'iode, qui teint au contraire les amas de cellules qu'elle renferme ; elle semble se rapprocher par là des membranes de constitution ternaire. Chez les familles de grande taille, elle mesure de 10 μ à 15 μ d'épaisseur.

On ne connaît que peu de détails des cultures de cette espèce. Elle se

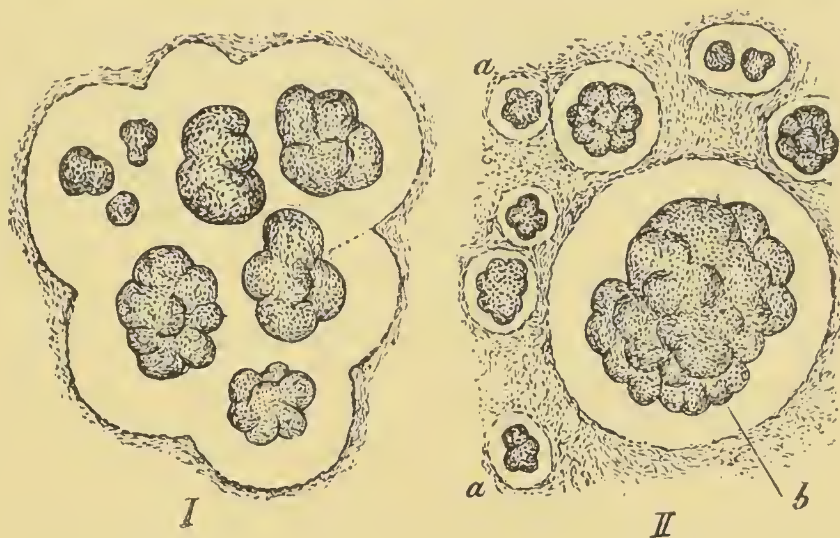


Fig. 243. — *Ascococcus Billrothii* : I, grosse colonie formée de huit familles ; — II, colonies isolées : *a*, petite colonie ; *b*, grosse colonie mamelonnée avec épaisse capsule (d'après Cohn).

cultive très bien dans la liqueur minérale de Cohn avec les caractères énoncés plus haut ; elle y développe rapidement une odeur de lait aigri ou d'acide butyrique, puis la réaction acide du milieu devient rapidement alcaline. Il se dégage de l'ammoniaque, facile à reconnaître avec une baguette de verre imprégnée d'acide chlorhydrique. Elle croît luxueusement sur des tranches de navets ou de betteraves cuites en donnant de grosses Zooglées blanches, légèrement verdâtres. Dans le jus sucré de betteraves, elle produirait une sorte de fermentation visqueuse, en transformant le sucre en un produit gommeux ; il se forme en même temps de l'acide butyrique.

Son habitat est l'air ; Cohn l'a obtenue en faisant barboter de l'air dans du liquide nutritif. Il est probable qu'on n'en a pas observé jusqu'ici de culture pure ; ce dernier observateur ne l'a eue que mélangée avec d'autres *Micrococcus*.

ASCOCOCCUS EQUI.

(*Botryomyces equi de Böllinger, Discomyces equi de Rivolta, Micrococcus ascoformans de Johne, Botriocoque.*)

C'est probablement à côté de l'*Ascococcus Billrothii* qu'il faut placer l'organisme découvert en 1870 par Böllinger (1) dans la *botryomycose* du cheval.

(1) Böllinger, Mycosis der Lunge beim Pferde (*Virchow's Arch.*, 1870, p. 583).

Il se rencontre en abondance dans les tumeurs fibromateuses spéciales, tantôt de petite taille, comme dans le poumon où l'on en rencontre de l'aspect et de la grosseur des tubercules ordinaires, tantôt de taille considérable, comme celles qui se développent dans le cordon testiculaire à la suite de la castration (*champignon de castration*) ou dans la cavité abdominale. De ces tumeurs fibreuses peuvent, du reste, se rencontrer un peu partout. Elles sont dures, lardacées, ou ramollies, laissant écouler, par un ou plusieurs orifices, un pus jaunâtre, grumeleux, pouvant montrer de petites granulations grises ou jaune pâle, d'environ $0^{mm},5$ de diamètre. Exceptionnellement, des lésions semblables se rencontrent chez les bovidés et le porc (1). Poncet et Dor (2) ont retrouvé le même microbe dans diverses tumeurs de l'homme, surtout de petites tumeurs papillomateuses, pédiculées, se trouvant de préférence à la main et aux doigts; depuis, d'autres auteurs ont rapporté des faits analogues.

Le microbe en question se trouve en grand nombre dans la masse des tumeurs ou les grumeaux du pus. Il est accompagné d'habitude des Bactéries ordinaires de la suppuration, ou d'autres espèces, le *Micrococcus de la septicémie du lapin*, le *Colibacille*, par exemple, qui jouent dans l'évolution de la maladie un rôle encore indéterminé.

Les éléments de l'*Ascococcus equi* sont des coccus arrondis, mesurant de 1 μ à 1,5 μ de diamètre et réunis, souvent en très grand nombre, pour former des masses ovoïdes mesurant de 10 μ à 100 μ et plus de longueur. Chacune de ces masses est entourée d'une sorte de capsule homogène, transparente et incolore. Les coccus se colorent facilement aux couleurs d'aniline, la capsule pas. *Ils restent colorés* par la méthode de Gram.

Des cultures ont été obtenues par Rabe (3), Poncet et Dor, Galli-Valerio (4) sur les différents milieux habituels.

Sur *plaques de gélatine*, on observe, après vingt-quatre heures à 20°, de petites colonies rondes ou ovoïdes, à contours légèrement sinueux, qui s'entourent déjà d'un cercle de liquéfaction. D'un blanc grisâtre à l'œil, elles sont jaune sombre, à peine granuleuses, au microscope. En une dizaine de jours, les plaques sont tout à fait liquéfiées et montrent, sur le fond, une poussière jaune-orange.

Sur *gélatine*, en piqûre, il se forme en vingt-quatre heures une petite colonie blanche, qui liquéfie très vite et donne, au troisième jour, une cupule de liquéfaction bien nette. La liquéfaction progresse vite, donne un entonnoir, puis un large cône de liquéfaction dont le liquide, clair, est surmonté d'une pellicule blanc jaunâtre et montre, à son fond, un dépôt de même couleur.

Sur *gélose*, à 37°, on trouve, après vingt-quatre heures, de petites colonies rondes, brillantes, blanc jaunâtre, à centre plus jaune. Elles

(1) Nocard et Leclainche, Les maladies microbiennes des animaux, 2e éd., p. 536.

(2) Poncet et Dor, De la botryomycose humaine (*XIe Congrès franç. de chir.*, 1897). — Poncet et Bérard, Traité clinique de l'actinomycose humaine: pseudo-actinomycose et botryomycose, 1898. — Ten Siethoff, Un cas de botryomycose observé chez l'homme (An. in *Sem. méd.*, 1898, n° 37, p. 302). — Legrain, La botryomycose en Algérie (*Ann. de parasitol.*, 1898, I, p. 148).

(3) Rabe, Ueber mykotiche Bindgewebswucherung bei Pferden (*Deutsche Zeitschr. für Thiermed.*, XII, 1886).

(4) Galli-Valerio, Contribution à l'étude de la botryomycose (*Centralbl. für Bakt.*, XXX, Originale, 1902, p. 598).

confluent vite en une large bande jaune-orange pâle. Cette culture peut se décolorer assez vite, mais redonne, par repiquage, des colonies jaunes.

Sur *sérum coagulé*, les colonies sont plus petites, plus bombées, d'un jaune doré, et ont moins de tendance à confluer.

Sur *pomme de terre*, à 37°, les colonies restent très petites, d'un jaune doré vif.

Dans le *bouillon*, à 37°, on obtient d'abord un voile blanc jaunâtre, avec un léger dépôt jaune ; puis tout se sédimente ; le liquide s'éclaircit, très tard, avec un dépôt jaune doré.

Le *lait* se coagule en trois à quatre jours.

Pour certains, les cultures dégagent une odeur agréable, rappelant celle de la fraise ; pour d'autres, elles sont inodores.

Les éléments de ces cultures sont des diplocoques ou des staphylocoques qui peuvent être réunis en amas ovoïdes par une sorte de gangue. Toutefois, on n'observe pas les capsules si nettes qui se rencontrent dans le contenu des tumeurs.

L'inoculation de cultures au cobaye ou au lapin donne soit une septicémie, soit des accidents locaux, de petits abcès ou de petits nodules suppurés, dans le pus desquels on peut rencontrer des grains jaunâtres semblables à ceux des tumeurs primitives, ou des diplocoques isolés ou réunis en petits amas sans capsules.

D'après Poncet et Dor, l'inoculation de cultures au cheval ou à l'âne déterminerait ou des suppurations à grains jaunes, ou des néoplasies identiques au champignon de castration ou aux tumeurs pédiculées de l'homme.

Chez le cheval, on observe un œdème inflammatoire qui se dissipe en huit ou dix jours ; puis, quatre ou six semaines après, il se produit de l'empâtement du tissu conjonctif, une sorte de tumeur dans laquelle on sent des nodosités plus dures qui peuvent s'ouvrir en laissant échapper un pus clair et visqueux montrant des quantités d'amas formés d'*Ascococcus* de différente taille (1).

Pour beaucoup, il n'y aurait pas à distinguer le *Botriocoque* du *Staphylocoque doré* ou du *Staphylocoque blanc* (2). Pour Parascandolo (3), les caractères des éléments, surtout la capsule, ceux des cultures et de leur inoculation, les réactions bénignes paraissent bien en faire un type spécial : le sérodiagnostic, les résultats d'immunisation les différencient.

Pour Letulle (4), les amas du *Botryomycome* seraient fournis par l'agglomération d'éléments de nature amibienne, en voie de dégénérescence hyaline. Bureau et Labbé (5) auraient pu isoler une Amibe de 50 à 60 μ, se reproduisant par division et pouvant s'enkyster. Les microbes isolés

(1) Voy. aussi : Bollinger, Ueber Botryomycose bei Pferd (*Ibid.*, XIII, 1887, p. 176), et Kitt, Der Micrococcus ascoformans und das Mykofibrom des Pferdes (*Centralbl. für Bakt.*, III, 1888, p. 177, 207 et 246).

(2) Frederic, Ueber die sogenannte münschliche Botryomykose (*Deutsche med. Wochenschr.*, 1909, n° 15).

(3) Parascandolo, Die Botryomykose (*Deutsche thierartz. Wochenschr.*, 1901, p. 182).

(4) Letulle, La botryomycose. Son histogenèse. Sa nature parasitaire (*Journ. de physiol.*, X, 1908, p. 256).

(5) Bureau et Labbé, Sur l'affection connue sous le nom de botryomycose et son parasite (*C. R. de l'Acad. des sc.*, XCLVII, 1908, p. 697).

seraient des espèces pyogènes d'infection secondaire, déterminant des phénomènes de suppuration dans la lésion.

2e FAMILLE. — BACTÉRIACÉES.

Ce groupe renferme des Bactéries dont les éléments, allongés suivant une direction, ont une longueur qui l'emporte sur la largeur. La forme typique est le *bâtonnet* ; il est tantôt court et trapu, apparaît en coupe optique presque comme un carré ou comme un court rectangle ; tantôt sa longueur dépasse un certain nombre de fois sa largeur. La première de ces dimensions peut devenir très grande par rapport à l'autre ; c'est la forme de *filament*. Les bâtonnets ou les filaments sont droits ou courbés. La courbure peut être très simple et ne représenter qu'une faible portion de circonférence ; elle peut être compliquée : l'élément décrit une spire à tours plus ou moins nombreux, plus ou moins serrés. Quelles que soient la forme ou la longueur de ces éléments, on ne leur distingue jamais d'extrémité antérieure et d'extrémité postérieure, de base ni de pointe ; les mouvements, lorsqu'ils existent, paraissent toujours se faire également dans les deux sens, et, quand des individus se fixent ou plutôt s'accolent à un support, leur partie fixée ne diffère en rien de celle qui reste libre.

Beaucoup d'espèces possèdent de véritables spores endogènes ; en variant les conditions de vie, on arrivera probablement à en reconnaître à la majeure partie des types de cette famille. Ces spores se produisent dans les cellules mères par condensation du protoplasma : elles sont tantôt plus grosses, ou plus petites que la cellule où elles se sont formées, tantôt égales à elle en largeur. Le plus souvent, au moins, il se forme une seule spore par cellule ; dans quelques cas, il semble pouvoir s'en produire deux. Il a pu alors, au préalable, se former dans la cellule un cloisonnement que la grande minceur et l'extrême transparence rendent difficile à distinguer (Voy. p. 75).

On peut réunir dans cette seconde famille les quatre genres suivants :

1er genre : *Bacillus*. Éléments en forme de bâtonnets, courts ou longs, droits ou légèrement courbés ;

2e genre : *Spirillum*. Éléments courbés, pouvant décrire une partie de circonférence ou une hélice à plusieurs tours ;

3e genre : *Leptothrix*. Longs filaments simples, droits ou parfois ondulés ;

4e genre : *Cladothrix*. Longs filaments droits ou ondulés, ramifiés d'une façon souvent assez régulière.

1er GENRE. — BACILLUS COHN.

Ce genre a été créé par Cohn (1) en 1872, pour les Bactéries en bâtonnets dont la longueur dépassait un certain nombre de fois la largeur. C'était chez ces seules espèces que l'on connaissait de véritables spores endogènes.

La longueur relative était le seul caractère qui le distinguait du genre *Bacterium*. Nous savons que ce caractère ne peut être considéré comme

(1) COHN, Beiträge zur Biologie der Pflanzen, I, 2e p., p. 173.

absolu, mais qu'il varie, au contraire, dans des limites très larges, pour des conditions de vie qui peuvent être considérées comme normales. De sorte que, suivant le milieu dans lequel elle évolue, une espèce pourrait être alternativement rangée dans le genre *Bacillus* et le genre *Bacterium*. C'est ainsi que, chez le *Bacillus megaterium* (fig. 244), les cellules végétatives ordinaires sont des bâtonnets assez longs (*1*, *9*); les cellules qui vont produire des spores sont très courtes, presque carrées (*2*, *3*, *4*, *5*, *6*). Des spores ont été constatées, du reste, chez d'anciennes espèces de *Bacterium* et permis ainsi de réunir dans un même groupe ces deux types si semblables.

Davaine (1) avait cru devoir distinguer autrefois un genre *Bacteridium*, caractérisé par l'immobilité des éléments à tous les stades de leur existence. Il l'avait établi pour la *Bactérie du charbon* et quelques autres observées dans l'intestin et les infusions. Mais l'absence ou la présence de mouvements n'offre jamais de constance suffisante pour en faire un caractère spécifique. Un grand nombre d'espèces, très mobiles à une certaine phase de leur existence, deviennent complètement immobiles à la période suivante ou seulement quand les conditions de vie, tout en restant bonnes, viennent à changer; beaucoup deviennent inertes, par exemple, au moment de la sporulation. Les Bactéries mobiles ne diffèrent, du reste, des immobiles par aucun caractère de valeur.

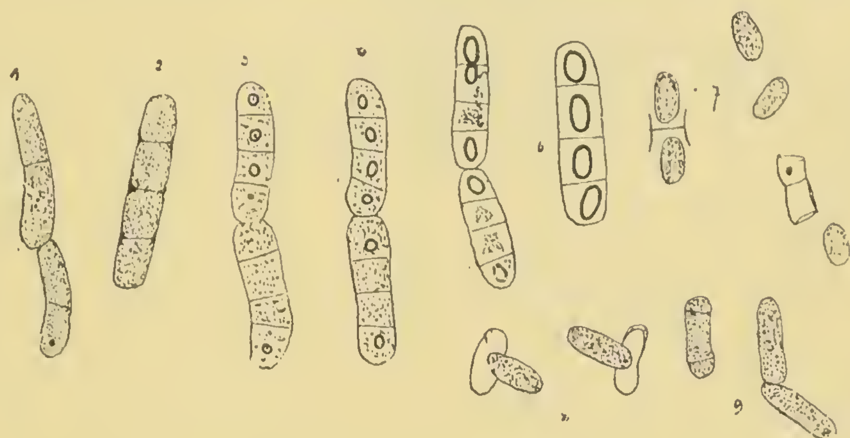


Fig. 244. — *Bacillus megaterium*. 600/1 (d'après de Bary).

Le genre *Vibrio* d'Ehrenberg était trop peu homogène pour être conservé. Le plus grand nombre de ses espèces sont de vrais *Bacillus*, le restant des *Spirillum*. Il en reste la dénomination française de *Vibrion*, que l'on ne doit pas considérer comme un terme de classification, mais comme une simple expression de valeur générale. Elle a été très employée par l'école de Pasteur, qui l'a appliquée à bien des Bactéries mobiles, *Micrococcus* ou *Bacillus*. Le *Vibrion pyogène* est un *Micrococcus*; le *Vibrion lactique*, le *Vibrion butyrique*, le *Vibrion septique* sont des *Bacillus*.

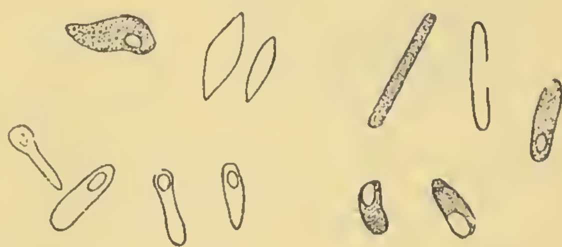


Fig. 245. — Bactérie du charbon symptomatique (d'après Arloing, Cornevin et Thomas).

(1) Davaine, art. Bactérie du *Dict. encyclop. des sc. méd.*, 1868, reproduit dans l'*Œuvre de Davaine*. Paris, 1889, p. 409.

Il en est de même du genre *Clostridium* établi par Prazmowsky (1) pour le *Bacillus butyricus* et d'autres espèces dont les bâtonnets se renflent à l'endroit où se produit la spore, et prennent ainsi une forme en fuseau, en massue, en têtard, en battant de cloche. La figure 245, qui représente des spores d'une des espèces types de ce genre, la *Bactérie du charbon symptomatique*, montre l'inconstance et l'irrégularité de ce caractère.

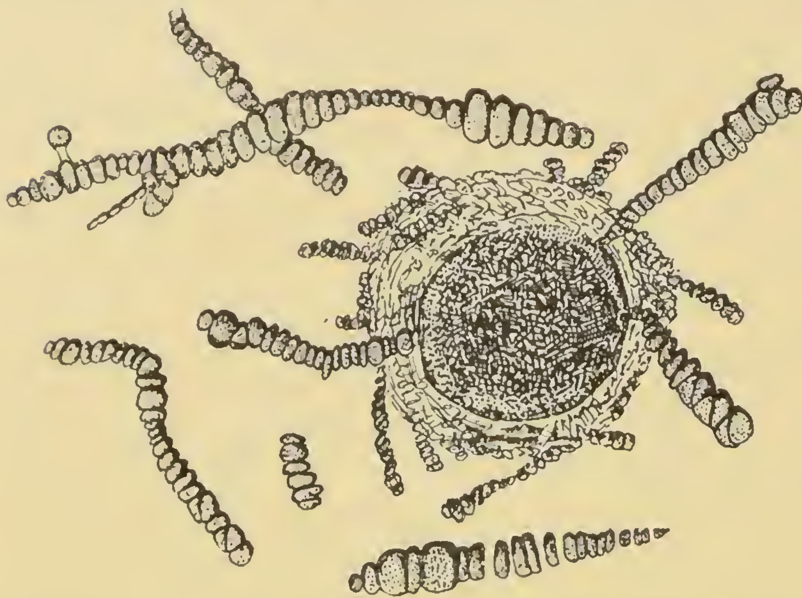


Fig. 246. — Colonie de *Proteus* sur plaques de gélatine.

Duclaux (2) a groupé sous la désignation de *Tyrothrix*, sans toutefois lui attribuer une valeur générique, toute une série d'intéressantes espèces qu'il a rencontrées dans les fermentations des albuminoïdes, en particulier de la caséine du lait. Ces *Tyrothrix* appartiennent tous au genre *Bacillus*, tel que nous le comprenons ici.

Les espèces désignées par Hauser (3) sous le nom générique de *Proteus* ne peuvent être séparées des Bacilles vrais. La variabilité de forme des éléments tient, nous l'avons dit déjà, surtout aux changements introduits dans la composition du milieu. Ces changements d'aspect n'ont, du reste, pas la valeur que leur assigne l'auteur ; ses formes spiralées ne sont que des filaments enchevêtrés, et ses coccus sont souvent des spores. Quant aux particularités intéressantes que présentent les colonies en culture sur plaques de gélatine (fig. 246), particulièrement la mobilité dans la gelée, elles sont loin d'être aussi distinctes et spéciales que le veut Hauser. Beaucoup d'autres espèces présentent, à des degrés divers, cette ramification des colonies et le déplacement lent dans la gélatine visqueuse, près de son point de liquéfaction, donnés ici comme spéciaux. On trouve tous les intermédiaires entre des colonies à expansions radiaires (fig. 247), et celles qui émettent de ces prolongements longs, sinueux, s'étendant au loin dans la gelée, pouvant même se séparer, à un moment donné, de la colonie centrale, lorsque la consistance du milieu est peu forte et s'y prête.



Fig. 247. — Colonie de *Bacillus mesentericus vulgaris*, sur plaques de gélatine.

Migula (4) établit trois genres pour les Bactéries en bâtonnets, en se basant surtout sur la mobilité et la disposition des cils.

(1) Prazmowsky, Untersuchungen über die Entwickelungsgeschichte und Fermentwirkund einiger Bacterienarten. Leipzig, 1880.

(2) Duclaux, Le lait (Étude chimique et microbiologique. Paris, 1887, p. 218 et suiv.), et Chimie biologique.

(3) Hauser, Ueber Faülnissbacterien. Leipzig, 1885.

(4) Migula, System der Bakterien, 1900, II, p. 279.

1er genre : *Bacterium*. Éléments cylindriques, courts ou plus ou moins longs, parfois même en filaments de longueur modérée, sans cils vibratiles. Endospores chez certains, pas chez d'autres.

2e genre : *Bacillus*. Éléments allongés, tantôt courts, tantôt longs, ovoïdes ou en forme de bâtonnets, souvent en longs filaments mobiles avec cils disposés sur toute la surface de l'élément. Endospores fréquentes.

3e genre : *Pseudomonas*. Éléments cylindriques, courts ou assez longs, parfois même en petits filaments, mobiles avec cils polaires. Endospores chez quelques espèces.

Ce sont là des caractères de valeur certainement ; mais on trouve toujours des types intermédiaires nombreux, qui constituent des passages d'une coupe à l'autre, formant des transitions complètes sans qu'on puisse marquer de délimitation nette, ce qui n'est pas d'une classification satisfaisante et réellement naturelle. De plus, cette classification conduit à éloigner bien des espèces qui ont entre elles des affinités très manifestes.

On peut conclure que, pour subdiviser un genre tel que le genre *Bacillus*, il est prudent d'attendre que l'on ait suffisamment bien décrit un plus grand nombre d'espèces et fixé d'une manière plus précise la valeur des différents caractères, sous peine d'être exposé à voir survenir des intermédiaires, reliant intimement des espèces que l'on a complètement séparées dans la classification. Il est, de plus, tout à fait nécessaire, pour établir des groupes de cette valeur, de n'employer que des caractères bien tranchés, n'offrant pas ces passages insensibles d'un type à l'autre, comme ceux que nous venons de constater.

Pour la *simple commodité de l'exposition et de l'étude*, nous grouperons les espèces du genre *Bacillus* que nous allons décrire en trois séries :

1° Espèces pathogènes ;
2° Espèces chromogènes ;
3° Espèces à actions de ferments, à actions diverses ou indifférentes.

ESPÈCES PATHOGÈNES

BACILLUS ANTHRACIS DAVAINE.

(*Bactéridie charbonneuse, Bacille du charbon.*)

ATLAS DE MICROBIOLOGIE, PL. IV ET V.

C'est l'agent de l'affection éminemment contagieuse connue chez l'homme sous le nom de *charbon* ou *pustule maligne*, chez le cheval sous celui de *fièvre charbonneuse*, chez le mouton sous celui de *sang de rate* et chez la vache sous celui de *maladie du sang*. Ces différences de désignation d'une seule et même maladie chez plusieurs espèces animales proviennent de la variabilité des symptômes, due à la diversité des modes de contagion, et aussi à la réceptivité propre à chaque espèce ; il n'a été

possible d'identifier ces affections que lorsqu'on a démontré qu'elles étaient dues à une cause unique.

Rayer et Davaine (1) ont signalé, en 1850, la présence de bâtonnets, dépourvus de mouvements spontanés, dans le sang de moutons morts du sang de rate. Pollender (2), en 1855, décrit dans le sang charbonneux des corps semblables, qu'il rapproche des *Vibrions* de putréfaction. Brauell (3), en 1857, retrouve ces mêmes *Vibrions*, mais les confond avec les Bactéries de putréfaction, qui se développent si rapidement dans le sang exposé à l'air ; pour lui, ils ne sont pas caractéristiques du charbon, mais apparaissent plus rapidement dans le sang des animaux charbonneux, où l'on peut les rencontrer même avant la mort. Mais l'étiologie de cette affection n'a été mise en évidence que par les recherches ultérieures de Davaine (4). Ce savant annonçait, en 1863 (5), à l'Académie des sciences, la constance dans le sang charbonneux de ces mêmes organismes, qu'il y avait aperçus treize ans auparavant, et montrait, en précisant leurs caractères, qu'ils se rapprochaient des Bactéries dont Pasteur étudiait alors les actions physiologiques si curieuses. Dans une série de mémoires, il exposait les résultats de ses inoculations expérimentales et en concluait au rôle capital que la Bactérie jouait dans l'infection. C'était déjà pour lui une véritable espèce, distincte des autres connues et surtout de celles si communes dans les putréfactions, qui, lorsqu'elles étaient pathogènes, déterminaient des accidents tout autres, de nature *septicémique*. Se basant même sur l'immobilité absolue des articles à toutes les périodes de l'existence, il avait cru devoir créer le nouveau genre *Bacteridium*, d'où le nom de *Bactéridie charbonneuse* encore souvent employé aujourd'hui. La morphologie de cette espèce fut établie dans ses moindres détails par Koch (6) en 1875, dans son étude magistrale qui a, entre autres détails, fait connaître les spores et leurs remarquables propriétés. Pasteur et ses élèves, Joubert, Roux et Chamberland, sont arrivés à obtenir des cultures pures de cette Bactérie et à reproduire à leur aide une affection en tout semblable à la maladie charbonneuse, apportant ainsi une preuve expérimentale des plus démonstrative. En même temps, ils élucidaient les points divers de l'étiologie et de la pathogénie du charbon, mettaient en lumière les moyens prophylactiques à opposer à son développement et découvraient la méthode si féconde de vaccination à l'aide des cultures à virulence atténuée (7).

(1) Rayer et Davaine, Inoculation du sang de rate (*Mém. de la Soc. de Biol.*, 1850, p. 141).

(2) Pollender, Mikroscopische und microchemische Untersuchung der Milzbrandblutes, 1855.

(3) Brauell, Versuche und Untersuchungen betreffend den Milzbrand der Menschen und Thiere (*Virchow's Arch.*, XI, 1857, p. 131).

(4) Davaine, Recherches sur les infusoires du sang dans la maladie connue sous le nom de *sang de rate* (*C. R. de l'Acad. des sc.*, t. LVII, 1863, p. 320, 351 et 386).

(5) Davaine, *C. R. de l'Acad. des sc.*, 1864 et 1865.

(6) Koch, Die Ætiologie der Milzbrand-Krankheit begründet auf die Entwickelungsgeschichte der Bacillus Anthracis (*Cohn's Beitr. zur Biol. der Pflanzen.* II. 1876, p. 277).

(7) Consulter pour plus de détails : Straus, Le charbon des animaux et de l'homme. Paris, 1887.

MORPHOLOGIE

Caractères microscopiques. — Le *Bacillus anthracis*, examiné dans le sang d'un animal mort du charbon, s'y trouve en bâtonnets d'une longueur moyenne de 5 μ à 6 μ sur une largeur de 1 μ à 1,5 μ. On les trouve isolés ou réunis à deux ou plusieurs, en courtes chaînes : parfois, probablement lorsque la division est rapide, les articles ne se distinguent pas facilement à première vue et semblent constituer un filament homogène atteignant jusqu'à 20 μ de long. A l'aide de bons objectifs et en faisant intervenir les réactifs colorants, on aperçoit les minces cloisons qui séparent les cellules dont la longueur est au plus le double de la largeur. Souvent, au contraire, les bâtonnets composant une même chaîne paraissent écartés les uns des autres ; il existe entre deux éléments qui se suivent un espace clair, dont la forme irrégulière est due à ce que les extrémités des articles ne sont pas coupées net, en carré, mais sont limitées par une ligne légèrement sinueuse ; l'aspect rappelle assez bien celui d'une tige de bambou, avec nœuds et entre-nœuds (fig. 248). C'est un caractère sur lequel Koch insiste beaucoup et qu'il donne comme tout spécial au *Bacillus anthracis*. Il permet de différencier cette espèce d'autres que l'on peut rencontrer dans les mêmes conditions. On ne l'observe que sur les préparations fixées et colorées aux procédés habituels, ce qui peut faire penser qu'il est dû à l'action des réactifs employés ; il n'en perd, du reste, aucunement sa valeur. Ce caractère ne se voit pas, d'ordinaire, sur les préparations faites avec des cultures.

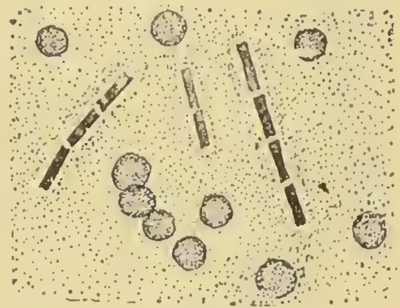


Fig. 248. — Sang de cobaye mort du charbon (Obj. apochr. 1,30. — Oc. 4, Zeiss).

Fréquemment, dans les produits provenant directement de l'organisme, autour des bâtonnets se distingue une mince zone claire, hyaline, qui paraît due à la couche périphérique gélifiée de la membrane (1), et constitue une véritable capsule (2). Cet aspect ne s'observe pas dans les produits des cultures. Cette capsule, n'existant que dans l'organisme, serait une protection contre les phagocytes (3) et pourrait même être considérée comme une formation de dégénérescence (4).

Lorsque ces Bactéries sont cultivées dans certains milieux, surtout liquides comme le bouillon, l'humeur aqueuse ou le sérum sanguin, elles croissent en très longs filaments de même largeur qu'elles, onduleux, enchevêtrés, formant parfois de véritables tresses, qui, traités par les réactifs, montrent d'ordinaire une segmentation en articles plus courts que les bâtonnets du sang. Ces filaments, comme les bâtonnets

(1) Preicz, Studien über Morphologie und Biologie der Milzbrandbacillus (*Centralbl. für Bakt.*, XXIV, 1904, p. 280).

(2) Kern, Ueber die Kapsel des Anthraxbacillus (*Centralbl. für Bakt.*, XXII, 1897, p. 166). — Fischreider, Beiträge zur Kenntniss der Milzbrandes (*Ibid.*, Originale, LI, 1909, p. 342).

(3) Gruber et Futaki, Seroactivität und Phagocytose (*Münch. med. Wochenschr.*, 1906, p. 249).

(4) Bail, Die Kapselbildung von Milzbrandbacillus (*Centralbl. für Bakt.*, XLVI, 1908, p. 488).

du reste, ne montrent qu'un protoplasma en apparence très transparent, presque dépourvu de granulations.

Ces formes sont toujours immobiles. Toussaint (1) a décrit de légers mouvements d'oscillation chez les très jeunes bâtonnets naissant de spores, mouvements qui cessent complètement quand l'élément a atteint assez de longueur pour se diviser. Nicolle et Trenel signalent une très légère motilité des bâtonnets du vaccin 1 de Pasteur, où Dupond (2) aurait réussi à mettre en évidence des cils répartis sur toute la surface. Ces assertions demandent à être vérifiées.

Formation des spores. — Lorsque des éléments bien vivants se trouvent en contact avec de l'oxygène libre, ils produisent rapidement des spores. Il ne s'en forme jamais en l'absence de ce gaz, ou en présence d'oxygène combiné, même quand la combinaison est facile à détruire, comme l'hémoglobine oxygénée ; il ne s'en forme jamais, par conséquent, dans le sang ou dans les tissus ou humeurs de l'organisme.



Fig. 249. — Formation des spores chez le *Bacillus anthracis*. 900/1.

Les longs filaments des cultures produisent très vite des spores dans leur intérieur. Bien qu'on décrive généralement les spores comme formant parfois des chapelets dans ces filaments, il ne semble pas qu'il puisse se produire plus d'une spore par article. La segmentation des filaments doit se faire avant la sporulation. Mais l'extrême minceur des cloisons et leur disparition, qui commence dès que la spore est formée, en rendent l'observation fort difficile. On aperçoit au début, en différentes parties de la longueur d'un filament, des séries de points sombres, qui sont l'indice d'une condensation du protoplasma. Chacune de ces taches grandit et forme une spore ovale, très réfringente, située au milieu du filament dont elle ne remplit pas la largeur (fig. 249). Peu de temps après la formation des spores, les filaments qui les ont produites pâlissent, leurs contours perdent leur netteté ; la membrane se gélifie et se dissout dans le liquide ambiant. La spore est mise en liberté. Pour germer, elle doit être transportée dans un milieu nouveau. Elle s'y développe rapidement, mais seulement quand elle est en présence d'oxygène libre ; le développement devient visible après trois ou quatre heures. D'après Koch, il se forme autour de la spore, aux dépens de la membrane, une zone claire, hyaline, qui l'entoure comme d'une auréole. La masse centrale s'allonge suivant son plus grand diamètre, perd son éclat et se trans-

(1) Toussaint, Recherches expérimentales sur la maladie charbonneuse (*C. R. de l'Acad. des sc.*, 1877).

(2) Dupond, Recherches sur la motilité et les organes moteurs des Bactéries. Thèse de Nancy, 1905.

forme directement en une cellule végétative. Tous ces différents processus, croissance des filaments, formation des spores, germination, s'observent facilement à l'aide des cultures en cellules sur porte-objet, dont le mode de préparation a été indiqué page 279.

Le temps qu'un *Bacille du charbon* bien vivace met pour donner des spores, dans les cultures, est fonction de la température. A 37°, 35° et 31°, la sporulation commence en moyenne après seize heures ; à 24°, après trente-six heures; à 18°, après cinquante heures. A 12°, quelques bâtonnets peuvent encore produire des spores; au-dessous, on n'en observe plus (1).

Le temps que les spores mettent à germer varie également avec la température. A 37°, la plupart des spores germent en huit heures environ ; à 24°, en seize heures; à 18°, en soixante-dix heures ; à 12°, la germination est difficile et très ralentie. Une nouvelle génération de spores se produit à 37°, après environ vingt et une heures ; à 30°, après vingt-deux heures; à 24°, après quarante-huit heures ; à 18°, après quatre-vingt-seize heures.

Les antiseptiques font perdre rapidement le pouvoir germinatif; d'après Weil (2), un court contact avec des solutions d'acide phénique à 1,5 p. 100 ou de formol à 1 p. 100 empêche les spores de germer dans les milieux de culture.

Les propriétés physiologiques des spores sont aussi intéressantes que les particularités de leur développement. Celle qui domine toutes les autres et joue le rôle le plus important est la résistance considérable de l'élément aux causes de destruction qui portent rapidement atteinte à la vitalité de la cellule végétative. Tandis que les bâtonnets ordinaires sont tués vers 60°, les spores complètement formées résistent, dans un milieu humide, à 95° pendant dix minutes et peuvent être chauffées à 80° pendant longtemps sans périr (3). Koch a pu même observer le développement de spores qu'il avait portées peu de temps à 123° dans l'air sec. Elles supportent de même l'action de l'oxygène comprimé et de très fortes pressions. Enfin la dessiccation, la privation d'aliments ou d'air, l'action de beaucoup d'antiseptiques n'ont aucune prise sur ces organes reproducteurs.

Sous des influences encore mal déterminées, des cultures de *Bacillus anthracis* peuvent perdre la propriété de former des spores tout en conservant leur virulence. Il se produit ainsi une variété *asporogène* pouvant infiniment se perpétuer telle quelle, uniquement par multiplication végétative. Chamberland et Roux (4) l'ont obtenue en faisant agir sur les cultures des doses faibles d'antiseptiques, de l'acide phénique et du bichromate de potasse surtout. Lehmann (5) a observé le même fait dans de vieilles cultures sur gélatine. Surmont et Arnould (6) donnent

(1) Weil, Zur Biologie der Milbrandbacillus. Thèse de Berne, 1899.

(2) Weil, Zur Biologie der Milzbrandbacillus. Thèse de Berne, 1899. — Zur Biologie der Milzbrandbacillus : Die Sporenauskeimung (*Arch. für Hygiene*, XXXIX, 1901).

(3) Roux, De l'action de la chaleur et de l'air sur les spores de la Bactéridie du charbon (*Ann. de l'Inst. Pasteur*, 1887, p. 392).

(4) Chamberland et Roux, Sur l'atténuation de la virulence de la Bactéridie charbonneuse sous l'influence des antiseptiques (*C. R. de l'Acad. des sc.*, XCVII, 1883, p. 1090).

(5) Lehmann, Ueber die Sporenbildung bei Milzbrand (*Münch. med. Wochenschr.*, 1887, n° 26).

(6) Surmont et Arnould, Recherches sur la production du Bacille du charbon asporogène (*Ann. de l'Inst. Pasteur*, VIII, 1894, p. 816).

comme procédé de choix, pour obtenir du charbon asporogène, le procédé de Roux à l'acide phénique : si, à son aide, on n'obtient pas de suite le résultat cherché, ils recommandent de soumettre au préalable le charbon à des cultures en série à 42°, en réensemençant de cinq en cinq jours.

Phisalix (1) a obtenu une variété asporogène et à éléments courts, presque ovoïdes, ressemblant un peu à des microcoques, en cultivant le microbe en sacs de collodion dans le péritoine du chien (*Bacillus anthracis brevigemmans*).

Dans les bouillons de culture, surtout dans ceux qui sont ensemencés depuis longtemps, on remarque souvent des filaments modifiés dans leur forme et leurs dimensions, présentant sur leur parcours des renflements irréguliers, ovoïdes ou en forme de bouteilles, des formes en clou, des formes courbes, des séries de grains plus ou moins arrondis, de diamètre très inconstant, souvent avec des vacuoles ; ce sont des *formes d'involution*, indice d'un certain épuisement du milieu. Plusieurs observateurs ont décrit, à tort, de ces formes arrondies comme des coccus, faisant partie normalement du cycle évolutif de l'espèce.

Coloration. — Les bâtonnets pris dans le sang ou les éléments des cultures se colorent très bien aux couleurs d'aniline par les procédés ordinaires. La fuchsine phéniquée de Ziehl ou la thionine phéniquée réussissent en particulier très bien. Ils *restent colorés* par la méthode de Gram. On obtient de belles colorations des spores et du restant des articles filamenteux qui les produisent par le procédé de double coloration des spores décrit page 393.

Les capsules se colorent bien aux méthodes spéciales de coloration des capsules indiquées page 398. L'emploi du bleu-éosine de Romanowsky (p. 388) donne aussi de bons résultats ; le protoplasma des éléments est coloré en bleu, des granulations chromatiques sont colorées en rouge, les capsules en rose brillant.

Cultures. — Les cultures du *Bacille du charbon* réussissent facilement sur tous les milieux. Il est facile d'en obtenir avec du sang d'animal charbonneux, qui, lorsqu'il est pris avec les précautions nécessaires, peut ne fournir que cette seule espèce. Dans les cas où plusieurs Bactéries s'y trouvent mélangées, l'emploi des cultures sur plaques permet aisément d'isoler le *Bacillus anthracis*, qui donne des cultures d'aspect si spécial et si caractéristique qu'il n'est guère possible de craindre une méprise.

Pasteur a employé, au début de ses recherches, les milieux dont il se servait à cette époque pour ses études sur les fermentations, surtout sa solution minérale et l'urine stérilisée et légèrement alcalinisée. L'espèce y végète, mais à coup sûr bien moins abondamment que dans les bouillons de viande, qui sont aujourd'hui le milieu liquide à choisir.

Le développement ne se fait exclusivement qu'en présence d'oxygène ; le *Bacille du charbon* est un *aérobie* vrai. La privation d'air tue rapidement les cellules végétatives, mais respecte les spores qui y résistent longtemps. Un certain degré de chaleur est nécessaire pour la croissance : la division ne pourrait plus s'opérer au-dessous de 12° ; les spores ne se forment plus au-dessous de 15°. Il paraît y avoir un

(1) Phisalix, Sur une variété de Bacille charbonneux à forme courte et asporogène ; *Bacillus anthracis brevigemmans* (*Soc. de Biol.*, 4 août 1900).

optimum de végétation situé vers 35°-37°. A 43°, la formation de spores s'arrête; la multiplication végétative continue lentement pour cesser bientôt tout à fait lorsque la température dépasse 45°. C'est un point intéressant à noter, dont nous trouverons bientôt une importante application, qu'il ne peut jamais se former de spores dans des cultures maintenues avec soin et sans interruption à 43°.

Cultures sur plaques de gélatine. — On obtient aisément de belles colonies sur plaques, en maintenant les cultures à une température d'au moins 15°. Dans ces conditions, on aperçoit déjà après vingt-quatre heures, à l'œil nu, de petits points blancs dans la gélatine. Examinés à un grossissement de 60 diamètres environ, ces points apparaissent comme autant de petites colonies granuleuses, arrondies, teintes d'une couleur jaune sale, à bords légèrement sinueux. Ces colonies grandissent de plus en plus; l'aspect de leur substance change. Au bout de trente-six heures, il se forme dans leur masse des filaments très reconnaissables, qui la font ressembler à un petit amas de fil irrégulièrement pelotonné; les sinuosités des filaments apparaissent nettement à la périphérie; certains d'entre eux peuvent même sortir de la masse et onduler dans la gélatine ambiante (fig. 250). Les colonies de trois ou quatre jours ont un aspect tout autre (fig. 251). Elles sont entièrement formées



Fig. 250. — Colonie de *Bacillus anthracis* développée sur plaques de gélatine après trente-six heures. 60/1 (d'après une photographie).

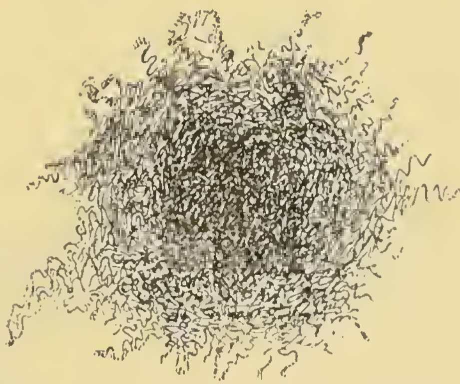


Fig. 251. — Colonie de *Bacillus anthracis* développée sur plaques de gélatine après trois jours. 60/1 (d'après une photographie).

par un rassemblement de filaments réunis en mèches ondulées d'aspect élégant, rappelant les cheveux bouclés, ou de flocons cotonneux blanchâtres, réguliers, plongés dans la gelée transparente. Quand les colonies ont atteint 3 ou 4 millimètres, la gélatine se liquéfie autour d'elles; elles se désagrègent, les flocons dissociés flottent dans un liquide clair.

Cultures dans le bouillon. — Dans du bouillon placé à l'étuve à 30°-35°, on observe en un jour des flocons blancs, assez denses, se former à la surface et surtout contre les parois du vase. Ces flocons peuvent rester adhérents au verre; le plus souvent, ils se détachent et tombent dans le liquide. Ils y nagent pendant assez longtemps et apparaissent alors comme de légers nuages dans le bouillon resté limpide; par agitation, ils n'en troublent pas la transparence. A un moment donné, ils se précipitent et forment, au fond du vase de culture, un sédiment blanchâtre, moins léger, qui se répand dans le liquide dès qu'on remue le ballon, et le trouble uniformément. On se rend faci-

lement compte de ses particularités, en examinant la culture au microscope, à chacune de ses différentes phases. Les filaments du début sont longs, flexueux, enchevêtrés ; les spores commencent à se former dans leur intérieur. Dès qu'ils tombent au fond du vase, la sporulation est terminée : la membrane commence à se résorber pour mettre les spores en liberté. Enfin le dépôt des cultures âgées est uniquement formé de spores libres, qui se répandent dans tout le liquide à la moindre agitation.

Cultures sur gélatine. — En *piqûre* dans un tube de gélatine, le



Fig. 252. — Très jeune culture sur gélatine de *Bacillus anthracis*.



Fig. 253. — Culture de *Bacillus anthracis* plus âgée.



Fig. 254. — Culture âgée de *Bacillus anthracis* sur gélatine. La gélatine est en partie liquéfiée.

développement est bien aussi caractéristique. Tout au début, de vingt-quatre à trente-six heures après l'inoculation d'habitude, il se forme dans le canal de la piqûre une mince bande blanchâtre, d'où partent, en direction perpendiculaire, de nombreux petits filaments droits, développés surtout dans la partie supérieure (fig. 252). La culture a un

aspect duveteux; G. Roux (1) la compare très heureusement à une mince radicule de plante en germination, munie de ses poils radiculaires. Cet aspect caractéristique s'observe surtout lorsqu'on ensemence du sang charbonneux. Ces filaments grandissent peu à peu et envahissent au bout de quelques jours toute la gélatine qui entoure la piqûre. La culture prend l'aspect représenté figure 253; elle ressemble à ces flocons blanc brillant qui surmontent le fruit de beaucoup de chardons. A la surface de la gelée se produit une mince colonie blanchâtre qui fait suite à celle qui s'est développée dans le canal. Après une dizaine de jours, la gélatine se liquéfie progressivement (fig. 254). Lorsque la liquéfaction a envahi une grande partie du tube, on voit nager dans le liquide complètement clair un gros flocon blanc, produit par la colonie duveteuse légèrement tassée sur elle-même. Plus tard, la colonie se désagrège, tombe et vient former un dépôt blanc sale au fond du tube.

Cultures sur gélose. — Sur gélose, il se produit le long de la strie une colonie blanchâtre, assez épaisse, d'une consistance friable, à bords souvent dentelés.

Cultures sur sérum. — Sur sérum coagulé, en strie, la culture, blanchâtre au début, liquéfie assez rapidement le milieu. Dans le sérum liquide, la culture prend, dès le second jour, l'aspect de flocons enchevêtrés; vers le douzième jour, le sérum est devenu plus consistant, comme gélatineux; la fluidité reparaît ensuite.

Cultures sur pomme de terre. — Sur pomme de terre, la végétation est abondante. Elle donne en quelques jours une couche épaisse, d'un blanc sale, opaque, à bords légèrement transparents. La culture dégage une odeur aigrelette.

Cultures dans le lait. — Ensemencé dans du lait stérilisé, le *Bacille du charbon* se développe très vite. Dans un ballon, au bout de quelques jours, le lait devient plus limpide et se colore légèrement en jaune. La matière grasse se rassemble à la surface et le petit-lait à la partie inférieure. A la longue, une partie de la matière grasse disparaît. Ces cultures prennent une odeur de fromage pourri et deviennent brunes après plusieurs mois. Dans un tube, au contraire, en deux ou trois jours, le lait est transformé en une masse solide, grumeleuse, qui occupe le fond du tube et est surmontée d'un liquide clair, incolore, fortement alcalin. D'après Roger (2), la modification est due à la sécrétion d'un ferment coagulant la caséine; dans le premier cas, la Bactérie, pouvant se développer dans le milieu largement aéré, consomme la caséine avant que la modification se soit produite.

PROPRIÉTÉS BIOLOGIQUES

Vitalité et virulence. — La vitalité du microbe varie suivant qu'il a formé des spores, ou pas. Les bâtonnets ordinaires sont peu résistants; dès que les spores sont formées, la résistance devient grande. Les cultures, faites comme nous venons de l'indiquer à une température de 15° au moins, possèdent une virulence identique à celle du sang pris sur un animal charbonneux. Les effets déterminés par l'inoculation de

(1) G. Roux, Traité de pathologie générale de Bouchard, t. II, p. 604.
(2) Roger, Action de la Bactéridie charbonneuse sur le lait (*Soc. de Biol.*, 18 mars 1893).

sang et de produits de culture sont identiques. La Bactérie du sang est tout aussi avide d'air que celle des cultures; seulement, elle enlève l'oxygène à la combinaison faible qu'il forme avec l'hémoglobine. C'est peut-être à cet état asphyxique qu'est due la teinte noirâtre du sang, observée aussi dans le charbon de l'homme, qui a fait donner le nom à la maladie. Toutefois, il faut se souvenir que les bâtonnets du sang ne forment jamais de spores et se reproduisent uniquement par division; les spores ne peuvent se former qu'à l'air, en présence d'oxygène libre.

Produits formés dans les cultures. — La matière albuminoïde des bouillons, celle du sérum, la caséine du lait, sont transformées en ammoniaque (1), qui donne aux cultures une réaction fortement alcaline; la transformation s'arrête, probablement avec la végétation, lorsque la proportion d'ammoniaque contenue dans le milieu a atteint un certain chiffre. D'après Iwanow (2), il se formerait, en outre, de l'acide acétique, de l'acide formique et de l'acide caproïque. Maumus (3) a observé, dans les cultures sur pomme de terre, la transformation de l'amidon en glucose, qui est alors probablement utilisé comme aliment par la Bactérie. M[lle] Napias (4) a démontré que le Bacille du charbon attaquait facilement les matières amylacées et les sucres en donnant de l'acide lactique, puis de l'acide acétique, qui peuvent même être brûlés quand l'hydrate de carbone vient à manquer; ces propriétés amylolytiques seraient plus marquées avec les races atténuées.

Dans les cultures sur milieux peptonisés, il se forme des traces d'hydrogène sulfuré, mais pas d'indol.

Les cultures virulentes renferment des produits toxiques déjà signalés par Toussaint (5) en 1878.

Hankin (6) a isolé de telles cultures une matière albuminoïde (albumose) toxique, à laquelle, d'après lui, la *Bactérie du charbon* devrait sa virulence. Il l'obtient en précipitant par l'alcool, lavant le précipité à l'alcool, séchant. Cette substance est excessivement toxique; à des doses très minimes, elle vaccinerait les animaux d'expérience contre les produits les plus virulents.

Plus tard, Hankin et Wesbroock (7) annoncent avoir retiré des cultures de Bacille du charbon une diastase particulière qui décompose les matières protéiques avec formation d'albumoses qui leur ont paru inactives. Le microbe peut, en outre, produire directement une autre albumose, qui, sans effet toxique à dose ordinaire, chez les animaux sensibles au charbon, aurait au contraire une action toxique énergique sur les animaux qui jouissent d'une immunité relative à l'égard du charbon,

(1) Perdrix, Sur la transformation des matières azotées dans les cultures de Bactéridie charbonneuse (*Ann. de l'Inst. Pasteur*, 1888, p. 354).

(2) Iwanow, Sur la production des acides volatils dans les cultures du Bacille charbonneux (*Ann. de l'Inst. Pasteur*, II, 1892, p. 131).

(3) Maumus, Sur la transformation de l'amidon végétal en sucre par le Bacille du charbon (*Soc. de Biol.*, 28 janvier 1893).

(4) M[lle] Napias, Action de la Bactéridie charbonneuse sur les hydrates de carbone (*Ann. de l'Inst. Pasteur*, XIV, 1900, p. 232).

(5) Toussaint, *C. R. de l'Acad. des sc.*, avril 1878.

(6) Hankin, Immunity produced by an Albumose isolated from Anthrax cultures (*British med. Journ.*, 1889, p. 810).

(7) Hankin et Wesbroock, Sur les albumoses et les toxalbumines sécrétées par le Bacille charbonneux (*Ann. de l'Inst. Pasteur*, VI, 1892, p. 633).

fait contraire à ce que l'on observe habituellement. En outre, cette albumose, à doses très petites, conférerait aux souris une très grande résistance, voire même parfois l'immunité complète, envers l'infection charbonneuse.

Martin (1) a rencontré dans des cultures âgées de dix à quinze jours, faites dans du sérum alcalinisé : 1° deux albumoses, proto-albumose et deutéro-albumose, et une trace de peptones; tous ces produits réagissent comme des peptones; 2° un alcaloïde; 3° de petites quantités de leucine et de tyrosine.

Les albumoses mélangées ne lui ont semblé toxiques qu'à des doses assez fortes; en les traitant par de l'alcool acidulé, on en obtient des traces d'un produit très toxique.

L'alcaloïde, soluble dans l'alcool, l'alcool amylique et dans l'eau, donne avec les acides des sels cristallisables. Il est plus toxique que les albumoses.

Brieger et Fraenkel (2), en opérant comme Hankin, ont obtenu une matière albuminoïde toxique, qui, à l'état sec, est une poudre grisâtre, très légèrement soluble dans l'eau.

Enfin, en dernier lieu, Marmier (3) a extrait, de cultures dans le sérum liquide et les bouillons, une substance toxique qu'il obtient en traitant le liquide filtré par le sulfate d'ammoniaque à saturation ; il se produit un précipité qui est recueilli sur filtre et lavé à l'eau saturée de sulfate d'ammoniaque. Par dessiccation, il reste une substance amorphe, pulvérulente, brunâtre, soluble dans l'eau, insoluble dans le chloroforme. Elle ne présente aucune des réactions des matières albuminoïdes, des peptones ou des alcaloïdes; elle est sans action sur l'empois d'amidon, sur les solutions de sucre de canne ou de glycogène. Inoculée aux animaux sensibles au charbon, elle amène à certaines doses la mort par cachexie; les animaux réfractaires au charbon paraissent insensibles aux inoculations. Elle est atténuée, mais non complètement détruite, par chauffage à 110°. En traitant des cultures sur gélose par de l'eau alcoolisée, on en retrouve dans le liquide: ce qui peut faire penser que cette toxine est contenue dans le corps des Bacilles et ne diffuse à l'extérieur que dans certaines conditions de milieu.

Les doses de ce produit qui peuvent amener la mort du lapin sont variables, et toujours très élevées par rapport à ce qui s'observe avec des toxines bien connues; il en est qui succombent avec 25 milligrammes, d'autres seulement avec 100 et 200 milligrammes. Ce ne sont pas là les caractères habituels des véritables toxines microbiennes.

Boidin (4), en traitant du produit de cultures par l'éther ou le chloroforme, a obtenu un extrait gras qui, à doses minimes chez le cobaye, produisait un gros œdème gélatineux.

Résistance aux conditions de milieu. — Ici, comme on le conçoit facilement, les résultats varient suivant que l'action s'exerce sur les

(1) Martin, The Chemical Products of the growth of Bacillus anthracis (*Proceed. of royal Society of London*, 22 mai 1890).

(2) Brieger et Fraenkel, Untersuchungen über Bacteriengifte (*Berlin. klin. Wochenschr.*, 1889, n°s 11 et 12).

(3) Marmier, Sur la toxine charbonneuse (*Ann. de l'Inst. Pasteur*, IX, 1895, p. 533).

(4) Boidin, Recherches sur les poisons de la Bactéridie charbonneuse (*Arch. de méd. expér.*, 1905, XVII, p. 695).

simples formes végétatives, bâtonnets ou filaments, ou sur des spores.

La spore résiste beaucoup plus à toutes les conditions défavorables que la simple forme végétative (1).

La *chaleur* tue rapidement les bâtonnets sans spores, ceux de cultures très jeunes ou ceux du sang frais, par exemple. D'après Roux et Chamberland, ces éléments sont tués après une chauffe de quarante minutes à 55°, même vers 50° après une heure d'action. D'après Weil (2), la mort des cellules végétatives survient, dans les bouillons, très vite aux températures voisines de 100° et après quelques minutes aux températures suivantes :

Après 1 minute à	80°
— 1 minute 1/2 à	79°
— 2 minutes à	78°
— 3 — à	75°
— 4 — à	70°
— 5 — 1/2 à	65°

A des températures plus basses, on peut encore obtenir la mort après un temps assez long; ainsi, du sang charbonneux ne renfermant pas d'éléments sporulés est stérilisé par un chauffage d'une demi-heure à 51°. Mais sans ces conditions la disparition de la virulence n'est pas brusque; ce que l'on observe, c'est une diminution graduelle de vitalité se traduisant par la lenteur à donner de nouvelles cultures, et une baisse graduelle également de la virulence, comme il sera dit plus loin (p. 668).

Les spores bien mûres résistent une dizaine de minutes à une température humide de 95°; 100° les tuent en trois ou quatre minutes. A sec, il faut faire agir 120° pendant plusieurs heures pour les tuer sûrement.

La *lumière solaire* détruit en huit à seize heures la virulence du sang charbonneux au contact de l'air; à l'abri de l'air, la virulence persiste beaucoup plus longtemps.

La *dessiccation* est peu active sur les bâtonnets; elle est sans action sur les spores.

Dans le sol, l'eau (3), dans des débris en putréfaction, les cellules végétatives ne meurent qu'après plusieurs mois; les spores se conservent très longtemps.

Les divers *antiseptiques* tuent facilement les cellules végétatives; ils ont bien moins d'action sur les spores. Ces dernières gardent leur virulence après avoir supporté l'action de l'alcool absolu pendant cent vingt-quatre jours, de l'acide phénique à 1 p. 1000 pendant soixante et un jours, du sublimé à 1 p. 1000 pendant une heure; le sublimé

(1) Roux, De l'action de la chaleur et de l'air sur les spores de la Bactéridie du charbon (*Ann. de l'Inst. Pasteur*, I, 1887). — Arloing, Influence de la lumière blanche et de ses rayons constituants sur le développement et les propriétés du *Bacillus anthracis* (*Arch. de Physiol.*, VII, 1886, p. 209). — Momont, Action de la dessiccation, de l'air et de la lumière sur la Bactéridie charbonneuse filamenteuse (*Ann. de l'Inst. Pasteur*, VI, 1892, p. 21).

(2) Weil, *Loc. cit.*, p. 657.

(3) Conradi, Ueber die Lebensdauer pathogener Bakterien im Wasser (*Centralbl. für Bakt.*, 1re Abth., Originale, XXXVI, 1904, p. 203).

à 2 p. 100 les tue en trente minutes, à 1 p. 100 en deux heures.

On observe un véritable *antagonisme microbien* entre le *Bacille du charbon* et d'autres espèces. La plus importante de ces dernières est le *Bacille pyocyanique*, comme l'ont bien montré Bouchard et Charrin. Dans les cultures en bouillon où les deux microbes sont ensemencés, le *Bacille pyocyanique* se développe seul, le *Bacille du charbon* a rapidement disparu. Le fait est dû à la production de pyocyanase qui jouit de propriétés bactériolytiques puissantes. Et cette dissolution du *Bacille du charbon* par la pyocyanase ne s'observe pas seulement *in vitro*, mais également dans les organismes vivants où s'exerce aussi la puissance bactéricide en question, à tel point qu'il est possible, en faisant intervenir la pyocyanase, d'empêcher l'infection charbonneuse chez le lapin.

D'autres microbes agissent dans le même sens. Le *Streptocoque* produit des effets semblables, mais moins énergiques. Le *Pneumobacille* est nettement antagoniste chez le lapin. Le *Staphylocoque doré* et le *Pneumocoque* agissent seulement dans les cultures. Enfin, dans le lait non stérilisé, les ferments lactiques pourraient faire disparaître le *Bacille du charbon* en vingt-quatre heures; il en serait de même pour certains processus putrides.

INOCULATION EXPÉRIMENTALE

L'infection de l'organisme peut se faire par des voies différentes. Le mode de pénétration le plus employé est l'inoculation sous-cutanée. Il suffit de faire une petite boutonnière à la peau d'un animal susceptible de contracter le charbon et d'y déposer quelques Bacilles ou quelques spores, ou, plus simplement, de la piquer avec une aiguille ou un instrument aigu trempé préalablement dans un produit virulent, pour voir l'affection apparaître et évoluer avec ses symptômes typiques. Ce mode d'infection est rare dans la nature, où, sauf pour l'homme qui s'inocule souvent par la peau, la porte d'entrée est ailleurs, généralement. C'est surtout par la surface intestinale que l'agent virulent pénètre dans le sang chez les animaux domestiques, où la maladie a été considérée pendant longtemps comme spontanée, soit que la muqueuse présente une de ces éraillures si fréquentes, qui permettent l'introduction directe, soit que les Bacilles puissent traverser activement les couches superficielles et parvenir dans le système sanguin.

Les différentes espèces animales sur lesquelles on est amené à expérimenter présentent des degrés divers de réceptivité pour la maladie charbonneuse. Parmi les plus sensibles, nous rencontrons ceux qui sont décimés par l'affection quand elle sévit épizootiquement, les moutons, les chèvres, les chevaux, les vaches. Avec eux, les lapins, les cobayes, les souris, sont des plus faciles à infecter. Les rats ordinaires présentent plus de résistance, ainsi que les jeunes veaux, d'après les expériences de Chauveau (1). Les rats blancs, qui ont été donnés par bien des observateurs comme réfractaires, ne présentent pas, d'après Metschnikoff (2),

(1) Chauveau, Sur la résistance des animaux de l'espèce bovine au sang de rate (*C. R. de l'Acad. des sc.*, XCI, 1880, p. 1526).

(2) Metschnikoff, Étude sur l'immunité, III : Le charbon des rats blancs (*Ann. de l'Inst. Pasteur*, IV, 1890, p. 193).

d'immunité complète; ils offrent seulement une résistance plus ou moins considérable qui peut être vaincue facilement. Il se produit chez eux, avec de fortes doses de matière virulente, une véritable affection charbonneuse qui se termine dans beaucoup de cas par guérison complète. Charrin et Roger ont démontré que le surmenage diminuait leur résistance au point d'obtenir l'infection onze fois sur treize. Les carnassiers sont souvent réfractaires; on a cependant quelquefois observé l'infection expérimentale du chien et du chat, surtout si l'on diminue, par un moyen quelconque, leur résistance vitale (1), qu'on leur inocule de grandes quantités de virus ou qu'on s'adresse à des animaux très jeunes. Le passage par le chien renforce la virulence de la Bactéridie, qui devient aussi plus courte et incapable de donner des filaments dans les liquides (2). Le renard serait réfractaire pour certains, pas pour d'autres. Les porcs sont, en général, difficilement infectés. Les jeunes porcs succombent plus facilement que les adultes. Les porcs des races américaines et anglaises prennent très facilement le charbon expérimental; les porcs hongrois sont bien plus résistants. Mais l'immunité la plus curieuse est sans contredit celle qui protège toute une race de moutons d'Algérie, les moutons *barbarins*; ce fait a été étudié par Chauveau (3). Les individus de cette race, même nés en France de parents qui y ont été élevés depuis plusieurs générations, résistent à des inoculations charbonneuses réitérées, qui tuent sans exception les moutons indigènes. Cette immunité cependant n'est pas absolue, elle peut être vaincue par l'introduction dans le sang de doses massives d'agent infectieux. D'autres fois, l'immunité n'est que relative; elle cède lorsqu'on fait disparaître certaines conditions mauvaises dans l'organisme réfractaire ou qu'on change ses conditions de vie. Les poules ont été longtemps considérées comme réfractaires; Pasteur (4) est parvenu à les faire périr du charbon en abaissant artificiellement leur température, ce qui s'obtient facilement en immergeant dans l'eau froide une partie du corps de ces oiseaux, les pattes par exemple; d'après Thiltges (5), cette immunité serait due principalement aux propriétés bactéricides de leur sérum sanguin et, secondairement, à l'activité phagocytaire des leucocytes. Le pigeon, surtout jeune, est moins réfractaire que la poule. En élevant la température du corps de grenouilles maintenues dans de l'eau à 35°, Gibier (6) leur a communiqué un charbon mortel, alors qu'elles passaient pour ne pas pouvoir le contracter. Il faut ici toutefois, comme dans les expériences de Fischel (7), faire la part du changement des conditions de milieu, en particulier de la température, qui peut seule causer la mort de l'animal en un

(1) Phisalix, Causes de la diminution de résistance des carnassiers au charbon (*Soc. de Biol.*, 10 avril 1897).

(2) Markel, Le charbon du chien (*Ann. de l'Inst. Pasteur*, XIV, 1900, p. 13).

(3) Chauveau, *C. R. de l'Acad. des sc.*, LXXXIX, 1879, p. 498 : — XC, 1880, p. 1526, et XCI, p. 23 et 680; — XCII, 1881, p. 510.

(4) Pasteur, Joubert et Chamberland, Sur le charbon des poules (*Bull. de l'Acad. de méd.*, 1878, p. 253 et 737, et 1879, p. 1222).

(5) Thiltges, Beitrag zum Studium der Immunität des Huhnes und der Taube gegen den Bacillus des Milzbrandes (*Zeitschr. für Hygiene*, XXVIII, 1898, p. 189).

(6) Gibier, De l'aptitude communiquée aux animaux à sang froid à contracter le charbon par élévation de leur température (*C. R. de l'Acad. des sc.*, t. XCIV, 1882, p. 1605).

(7) Fischel, Untersuch. über Milzbrandinfektion bei Fröschen und Kröten (*Fortschr. der Med.*, IX, 1891, n° 2).

très court délai (Voy. p. 343). Il est bien probable que pour les grenouilles, de même pour les crapauds d'après Galli-Valerio (1), la mort est le résultat de conditions de température défavorables, le développement des *Bacilles du charbon* devant être, dans ces conditions, considéré comme une invasion agonique. D'après ce dernier, les couleuvres et les lézards ne seraient pas non plus réceptifs. Les inoculations faites sur diverses espèces d'Invertébrés, en particulier les escargots, n'ont donné que des résultats dont on peut douter. L'âge ou l'état de santé d'un individu peut du reste influer considérablement sur l'effet de l'infection. Un animal malade sera tué avec des doses infimes, qui ne détermineront que des troubles passagers chez un congénère bien portant. De même un animal jeune succombera bien avant un adulte, et d'autant plus vite qu'il sera moins âgé; des cultures peu virulentes ne détermineront chez des lapins ou des cobayes adultes qu'une maladie guérissable, tandis qu'elles en feront irrévocablement périr d'autres beaucoup plus jeunes ou âgés de quelques jours seulement.

Chez le cobaye et le lapin, l'injection sous-cutanée de quelques gouttes de sang charbonneux frais ou d'une culture récente de *Bacillus anthracis*, ou plus simplement la piqûre de la peau avec une lancette ou une aiguille chargée de produits charbonneux, détermine au point d'inoculation, au bout de dix à quinze heures, un œdème assez prononcé; la température s'élève de 1 ou 2 degrés. L'animal garde son appétit et ses apparences de santé jusqu'à quelques heures avant sa mort qui survient de trente-six à quarante heures après l'inoculation chez le cobaye, de quarante-huit à soixante chez les lapins. Il s'assoupit tout d'un coup, est pris de dyspnée, tombe dans le coma et meurt après quelques légères convulsions et une température très basse, 34°-32°, même 30°.

A l'autopsie, la partie du corps où a été faite la piqûre présente un œdème gélatineux; le liquide rougeâtre que l'on y recueille fourmille de bâtonnets plus longs que ceux qui se trouvent dans le sang. Les ganglions lymphatiques de cette région sont gonflés; ils contiennent une quantité considérable de Bactéries. La rate est tuméfiée, diffluente; le foie et le poumon sont gorgés de sang noir. Il en est de même de tous les vaisseaux. Le sang pris dans toutes ces parties est noir, poisseux, se coagule difficilement; il montre de nombreux bâtonnets. Ces Bactéries remplissent souvent les réseaux capillaires et, s'accolant aux parois des vaisseaux, peuvent en obturer complètement l'orifice et amener des ruptures vasculaires. C'est de là que viennent celles que l'on rencontre dans l'urine ou le lait (2) d'animaux de plus grande taille. C'est aussi de cette manière qu'elles peuvent, chez des femelles pleines atteintes de charbon, pénétrer dans le placenta et contaminer le fœtus dans le corps même de la mère (3). Les organes parenchymateux ne renferment pas

(1) Galli-Valerio, Action de *B. anthracis* sur quelques animaux à sang froid, en particulier sur le crapaud (*Centralbl. für Bakt.*, Orig., XLIX, 1909, p. 514).

(2) Chambrelent et Moussous, Expériences sur le passage des Bact. charbonneuses dans le lait des animaux atteints de charbon (*C. R. de l'Acad. des sc.*, XCVII, 1883, p. 1142).

(3) Straus, Le charbon des animaux et de l'homme, p. 133 et suiv. — Koubassoff, Passage des microbes pathogènes de la mère au fœtus (*C. R. de l'Acad. des sc.*, CI, 1885, p. 101). — Marchand, Ueber einen merkwürdigen Fall von Milzbrand bei einer Schwangeren mit tödlicher Infection des Kindes (*Virchow's Arch.*, CIV, 1887, p. 86).

de bâtonnets, à moins qu'ils ne soient le siège de processus hémorragiques.

IMMUNITÉ, VACCINATION ET SÉROTHÉRAPIE

Il est des espèces ou des races qui possèdent à l'égard du charbon une véritable immunité. Des individus, dans les espèces sensibles, sont certainement réfractaires (p. 666). C'est le fait d'une immunité naturelle dont on ne peut pas encore donner d'explication sûre.

Il semble qu'une atteinte de charbon produise chez l'homme un certain degré d'immunité ; c'est difficile à affirmer en raison de la grande variabilité de l'infection charbonneuse chez lui. Pasteur a observé que les vaches guéries de la fièvre charbonneuse, ce qui est rare mais se voit cependant, supportaient sans périr les inoculations virulentes. Il en a conclu qu'une atteinte bénigne pouvait rendre les animaux réfractaires et a été conduit à employer les virus atténués.

Lorsqu'on fait intervenir certaines conditions, la virulence des cultures de *Bacille du charbon* ne se maintient pas à son degré maximum, mais décroît peu à peu, à mesure qu'agissent les causes qui peuvent l'amoindrir. C'est à Pasteur que revient l'honneur d'avoir pu déterminer le premier par quel moyen on pouvait arriver à obtenir des séries de virus à action de moins en moins nuisible, variant en plus ou en moins suivant le désir de l'expérimentateur. Il avait démontré que l'atténuation des cultures de *Micrococcus du choléra des poules* était due, en partie au moins, sinon en totalité, à l'action prolongée de l'oxygène ; le même procédé était à appliquer au *Bacillus anthracis*. Mais, pour cette dernière espèce, il y avait à tenir compte de la présence constante, dans les cultures ordinaires, des spores, si résistantes, qui s'opposent à toute tentative d'atténuation. Pasteur a résolu très habilement la difficulté en empêchant la formation des spores dans les cultures qu'il voulait atténuer. Il y est arrivé en maintenant ces bouillons à une température de 43°, à laquelle, nous l'avons vu, les filaments ne peuvent plus produire de spores. A cette température, la multiplication végétative se fait encore bien, elle ne cesse qu'au-dessus de 45° ; mais les cultures ne possèdent plus la résistance qu'elles devaient uniquement à leurs spores. Maintenue dans ces conditions au contact de l'air pendant un mois, une culture est morte ; quelques jours avant, elle contenait des cellules vivantes capables de fertiliser de nouveaux milieux, mais était dépourvue de toute virulence, que toute culture a perdue après huit jours d'un semblable traitement. Entre le premier et le huitième jour, fait important, la culture passe par des degrés divers d'atténuation : elle devient d'autant moins virulente qu'on s'éloigne du point de départ. Comme ces virus atténués confèrent, au moins partiellement, l'immunité contre la maladie, une méthode pratique de *vaccination charbonneuse* était imaginée ; elle a donné jusqu'ici, comme on sait, des résultats excellents (1).

Dans la pratique ordinaire, pour la vaccination des bovidés et des moutons, Pasteur a été conduit à employer d'abord un virus faible,

(1) Pasteur, Chamberland et Roux, De l'atténuation des virus et de leur retour à la virulence (*C. R. de l'Acad. des sc.*, XCII, 1881, p. 427), et Le vaccin du charbon (*Ibid.*, p. 666). — Chamberland, Le charbon et la vaccination charbonneuse, d'après les récents travaux de M. Pasteur. Paris, 1883.

premier vaccin, dont l'inoculation aux animaux ne peut pas occasionner de troubles graves, mais permettant, après quelques jours, de supporter un virus plus fort, deuxième vaccin, qui, employé d'emblée, aurait pu provoquer des accidents graves et même mortels. Le vaccin II est inoculé de douze à quatorze jours après le vaccin I. Les doses usitées sont, dans les deux opérations, de $0^{cc},25$ pour les bovidés et moitié pour les moutons. L'inoculation se fait dans la peau de l'épaule chez les bovidés et à la face interne de la cuisse chez les moutons.

Pour les animaux plus sensibles, comme le lapin, il faut employer jusqu'à quatre vaccins de virulence croissante, en commençant par un très atténué, plus atténué que le vaccin I, pour arriver à un bon résultat (Feltz) (1).

Les animaux ainsi vaccinés supportent facilement sans souffrir les inoculations bien virulentes et sont réfractaires à la contagion naturelle.

Les éléments de la Bactérie atténuée ne diffèrent que bien peu de ceux des cultures très virulentes; quelques minimes détails de culture ou d'aspect, et c'est tout, si bien que, pour un observateur non prévenu, il ne serait pas possible de faire de distinction. Ces détails, du reste, disparaissent complètement dès qu'on provoque la formation de spores dans les bouillons atténués et qu'on en obtient des cultures nouvelles. Mais alors l'action physiologique ne revient pas à son point de départ: la spore fixe, pour ainsi dire, la virulence que possédait la culture où elle s'est formée et la reproduit identique dans la nouvelle culture.

Il est cependant possible de ramener une Bactérie ainsi atténuée à sa virulence première en la faisant passer successivement dans le corps d'animaux de moins en moins impressionnables. Une Bactérie donnée, inoffensive pour le cobaye adulte, pourra tuer le cobaye d'un jour; sa virulence se renforce alors un peu, elle fera périr un cobaye de deux jours. Et ainsi de suite, petit à petit, après une période assez longue et des passages assez nombreux, elle fera mourir le cobaye de huit jours, puis celui d'un mois, puis un adulte de plus en plus fort, et enfin deviendra très virulente pour le mouton lui-même. Elle est revenue à sa force primitive, qu'elle gardera si l'on n'intervient pas pour l'atténuer.

La méthode employée par Pasteur n'est pas la seule qui conduise à l'atténuation de la virulence des cultures de *Bacillus anthracis*, et par suite à la préparation de vaccins. Avant que ce savant soit arrivé à obtenir les résultats que nous venons d'indiquer, Toussaint (2) avait annoncé la possibilité d'obtenir un vaccin efficace en chauffant à 55°, pendant dix minutes, du sang charbonneux défibriné, ou en ajoutant à ce même liquide 10 p. 100 d'acide phénique. Chauveau (3) a repris l'étude de ce procédé et l'a appliqué à l'atténuation des bouillons de culture. La diminution de la virulence, dans ce cas, est d'autant plus rapide que la température est plus élevée; ainsi, tandis qu'une culture maintenue à 45° demande quelques jours pour s'atténuer suffisamment, le même résultat pourra être obtenu en quelques heures à 47°, et en quelques minutes de 50° à 53°. Pour Chauveau, dans cette action l'influence de l'oxygène est nulle; c'est par l'excès de la chaleur seul que

(1) Feltz, *C. R. de l'Acad. des sc.*, 1882, p. 859.

(2) Toussaint, De l'immunité pour le charbon acquise à la suite d'inoculations préventives (*C. R. de l'Acad. des sc.*, XCI, 1880, p. 135 et 303).

(3) Chauveau, *C. R. de l'Acad. des sc.*, XCIV, 1882, p. 1694, et XCVI, 1885, p. 533.

les cultures s'atténuent, s'altèrent et meurent. Chamberland et Roux (1) sont parvenus, comme Toussaint, à obtenir une atténuation de virulence, en ajoutant aux cultures des doses plus ou moins fortes d'antiseptiques; pour eux, la condition exclusive de l'atténuation serait aussi le manque de formation de spores, déterminé par le composé toxique. D'autres facteurs donnent des résultats identiques; Chauveau (2) a obtenu une atténuation rapide en faisant agir l'oxygène comprimé; Arloing (3) a observé une diminution graduelle et finalement une disparition complète de la virulence des cultures sous l'influence des rayons solaires. C'est encore cependant jusqu'ici la méthode de Pasteur qui donne les résultats les plus constants et les plus sûrs.

La vaccination charbonneuse d'après la méthode de Pasteur est entrée aujourd'hui dans le domaine de la grande pratique; appliquée au mouton, elle a pour résultat une très grande diminution de la mortalité dans certains districts où le sang de rate causait des pertes considérables.

On a vu qu'en faisant intervenir assez longtemps l'action combinée de l'air et de la chaleur, il était possible d'obtenir des cultures tout à fait dépourvues de virulence et conservant indéfiniment cette propriété, tout en végétant bien dans les milieux ordinaires. C'est un exemple d'une transformation d'une espèce pathogène en saprophyte: mais il faut se hâter d'ajouter qu'on ne peut pas affirmer qu'elle ne puisse pas redevenir pathogène à un moment donné, sous l'influence de conditions qui sont inconnues jusqu'ici.

L'immunité peut être obtenue par l'action des produits solubles seuls. Hankin (4) est parvenu à immuniser des lapins et des souris contre le charbon en leur inoculant des doses très minimes de l'albumose qu'il retirait des cultures (p. 662). Les expériences de Petermann (5) et celles ultérieures de Hankin et Wesbrook (6) ont dû faire reconnaître que, si cette immunité s'observait, elle était au moins irrégulière et peu durable. Roux et Chamberland (7) ont obtenu l'immunisation du mouton par injection de sang charbonneux, ne renfermant pas de spores, préalablement stérilisé par chauffage d'une heure à 58° ou par addition d'antiseptiques; les produits solubles seuls agissent ici. Marchoux (8) et Sclavo (9) ont constaté en même temps que le sérum des animaux immunisés possédait des propriétés préventives contre les inoculations virulentes et curatives dans de certaines conditions à l'égard du charbon déclaré.

(1) Chamberland et Roux, Sur l'atténuation de la virulence de la Bactéridie charbonneuse sous l'influence des antiseptiques (*Ibid.*, XCVII, 1883, p. 1088 et 1410).

(2) Chauveau, De l'atténuation des cultures virulentes par l'oxygène comprimé (*C. R. de l'Acad. des sc.*, XCVIII, 1884, p. 1232, et C, 1885, p. 320).

(3) Arloing, Influence de la lumière blanche et de ses rayons constituants sur le développement et les propriétés du *Bacillus anthracis* (*Arch. de physiol.*, t. VII, 1886, p. 209).

(4) Hankin, *Loc. cit.*, p. 662.

(5) Petermann, Recherches sur l'immunité contre le charbon au moyen des albumoses extraites des cultures (*Ann. de l'Inst. Pasteur*, VI, 1892, p. 32).

(6) Hankin et Wesbrook, *Loc. cit.*, p. 662.

(7) Roux et Chamberland, Sur l'immunité contre le charbon conférée par des substances chimiques (*Ann. de l'Inst. Pasteur*, II, 1888, p. 405).

(8) Marchoux, Sérum anticharbonneux (*Ann. de l'Inst. Pasteur*, IX, 1895, p. 785).

(9) Sclavo, Sulla preparazione del siero anticarbonchioso (*Rivista d'Igiene*, 1896). — La Sieroterapia del carbonchio ematico (*Ibid.*, 1898). — Nuove ricerche sperimentali sul potere curativo del siero anticarbonchioso (*Ibid.*, 1901).

Les expériences de Marchoux ont montré que le sérum des lapins était relativement peu actif ; de plus, en saignant par la fémorale ou la carotide, on peut tout au plus obtenir de 50 à 70 centimètres cubes de sang par animal. Les moutons, au contraire, peuvent d'abord fournir beaucoup plus de sang, et de plus, une fois vaccinés, supportent très bien l'injection sous-cutanée de doses de plus en plus fortes, jusqu'à 250 et 300 centimètres cubes, de cultures très virulentes. Leur sérum, recueilli de quinze jours à trois semaines après l'inoculation, a une activité beaucoup plus grande que le sérum de lapin; 1 centimètre cube injecté vingt-quatre heures avant une inoculation d'un quart de centimètre cube de culture virulente y rend réfractaire un lapin de 2 kilogrammes. La production est déjà efficace huit heures après l'injection de sérum.

Sclavo s'est d'abord servi du mouton, qui recevait en premier lieu des vaccins pastoriens, puis était traité par des quantités progressivement croissantes de cultures virulentes. L'âne, ainsi immunisé, lui a fourni un sérum notablement plus actif.

Les recherches d'autres observateurs, et en particulier celles de Sobernheim (1), ont confirmé et étendu ces données.

On peut immuniser dans ce but divers grands animaux, mouton, âne, chèvre, cheval, bovidés. Pour obtenir un sérum puissant, le mouton réussit généralement bien; comme l'avait signalé Sclavo, l'âne est encore bien préférable. Le cheval et les bovidés peuvent être traités plus énergiquement et plus rapidement que le mouton.

On inocule d'abord à l'animal choisi les deux vaccins pastoriens suivant la méthode habituelle pour la vaccination, puis on injecte des doses croissantes de cultures virulentes, massives à la fin, d'abord en injection sous-cutanée, ensuite en injection intraveineuse. L'âne supporte très bien des doses massives en injection intraveineuse. On se sert de cultures sur gélose, émulsionnées dans de la solution physiologique. Chaque injection est séparée de la suivante par une période de dix à quatorze jours. Après l'injection, on observe une assez forte réaction fébrile qui dure de huit à dix jours. La prise de sang peut se faire deux à trois semaines après la dernière injection.

On peut aussi très avantageusement se servir au début d'un sérum actif, antérieurement obtenu. On obtient de suite une immunité suffisante pour pouvoir passer de suite aux inoculations virulentes.

San Felice (2) préfère se servir du chien, qui supporte facilement les inoculations de charbon virulent. Il inocule d'abord pendant une quinzaine de jours au moins, suivant les symptômes produits, tous les deux ou trois jours, une culture atténuée par l'exposition à 45°-50°, pendant cinq à sept jours; puis fait une série d'inoculations de cultures virulentes, répétées dix, quinze ou vingt fois, chaque deux ou trois jours. Le sérum obtenu rend le lapin réfractaire à la dose de 3 centimètres cubes

(1) Sobernheim, Experimentelle Untersuchungen zur Frage der aktiven und passiven Milzbrandimmunität (*Zeitschr. für Hygiene*, XXV, 1897, p. 301). — Untersuchungen über die Wirksamkeit des Milzbrandserums (*Berl. klin. Wochenschr.*, 1897, n° 42). — Weitere Mittheilungen über aktive und passive Milzbrandimmunität (*Ibid.*, 1899, n° 13). — Ueber ein neues Verfahren der Schutzimpfung gegen Milzbrand (*Ibid.*, 1902, n° 29).

(2) San Felice, Untersuchungen über die Wirksamkeit des Milzbrandserums des Hundes als Schutz und Heilmittel (*Centralbl. für Bakt.*, XXXIII, 1902, Originale, p. 61).

et demi par kilogramme du poids du corps. Injecté à la dose de 7 centimètres cubes par kilogramme du poids, il empêche la mort chez des lapins inoculés dix, vingt, trente et même quarante heures auparavant avec des spores charbonneuses.

Un sérum anticharbonneux, obtenu à l'aide de ces méthodes, possède des propriétés préventives réelles et paraît avoir une certaine valeur curative.

Sa manière d'agir n'est pas encore connue. Il n'a aucune propriété bactéricide, la bactéridie y pousse aussi bien que dans du sérum normal. Il ne semble pas augmenter la phagocytose, ni jouir d'aucune propriété opsonisante, ni impressionner les microbes de façon à faciliter leur destruction. Son rôle antitoxique reste toujours des plus douteux, puisque la question d'une toxine charbonneuse est encore bien obscure et nullement résolue. On a dit qu'il empêchait la formation de la capsule jouant un rôle de protection pour la Bactérie; c'est encore à démontrer.

Son action préventive est certaine. Le sérum donne une immunité rapide, mais peu durable. Ainsi, employé seul, il ne pourrait pas servir à vacciner d'une façon pratique et suffisante. Mais en faisant intervenir, après son emploi, des inoculations virulentes, qui sont alors bien supportées, on obtient de bons résultats. Sobernheim (1) dit même qu'il préfère cette dernière méthode aux vaccinations pastoriennes ordinaires, comme permettant d'obtenir plus rapidement une immunité durable. On peut avantageusement l'appliquer, d'après Carini (2), à la préservation de troupeaux menacés d'épidémie, en injectant au mouton 15 centimètres cubes, à la vache 20 centimètres cubes de sérum, puis immédiatement le vaccin pastorien fort. Il serait possible de l'utiliser pour l'homme, lorsqu'il y a menace sérieuse, par exemple chez des ouvriers manipulant des produits très suspects.

Au point de vue curatif, on a déjà d'intéressants résultats. Marchoux a montré qu'une injection de sérum empêchait l'infection de se produire chez le lapin inoculé vingt-quatre heures auparavant. Chez de grands animaux, des doses de 50 et 100 centimètres cubes, employées en une fois ou répétées, ont donné des succès dans des cas graves.

Chez l'homme, il est plus difficile de se prononcer, parce que d'abord le charbon guérit souvent seul, puis que, d'un autre côté, lorsque le diagnostic peut être posé, l'infection peut dater et être alors profonde. Dans un certain nombre de cas de charbon externe, où la sérothérapie a été employée, elle semble avoir réellement donné de bons résultats: elle paraît limiter la lésion locale et agir efficacement sur l'état général, surtout sur la réaction fébrile (3). Elle peut sembler indiquée dans les cas de charbon interne, toujours mortels.

HABITAT ET RÔLE ÉTIOLOGIQUE

La porte d'entrée du virus dans l'organisme, pour nos animaux domestiques, paraît être la surface du tube digestif; Pasteur a montré qu'en mêlant à des aliments, contaminés par des cultures virulentes, des

(1) Sobernheim, Ueber das Milzbrandserum und seine praktische Anwendung *Deutsche med. Wochenschr.*, 1904, p. 948).

(2) Carini, L'emploi du sérum anticharbonneux dans la pratique vétérinaire (*Schweiz. Arch. für Thierheilkunde*, décembre 1904).

(3) Bormans, Cura sieroterapica anticarbonchiosa Sclavo (*Rivista di Igiene*, XVIII, 1907). — Boidin, La sérothérapie anticharbonneuse (*Presse médicale*, 25 mai 1910).

substances dures, piquantes, pouvant léser la paroi du tube intestinal, on déterminait, chez les moutons, des contaminations dans une proportion énorme. Il serait nécessaire pour lui qu'il existât sur la muqueuse, celle des voies antérieures surtout, pharynx, œsophage, des éraillures qui permissent le passage direct des Bactéries dans le sang. Pour Koch (1), point n'est besoin de ces lésions, la pénétration se fait directement par la muqueuse intestinale; mais comme les cellules végétatives sont tuées par le suc gastrique, pour qu'il y ait infection dans ce cas, il faut que l'animal ait avalé des spores. Celles-ci arrivent intactes dans l'intestin et y trouvent un milieu alcalin favorable à leur germination; elles donnent des bâtonnets qui se multiplient et pénètrent dans le sang en traversant la muqueuse. L'infection se produit donc par les voies digestives; c'est un point à retenir pour tracer la prophylaxie de cette affection. Elle pourrait se faire aussi par les voies respiratoires; Büchner (2) a réussi à faire périr du charbon des souris qu'il confinait dans un espace où étaient pulvérisées des poussières fines, inertes, auxquelles il avait mélangé des spores de *Bacillus anthracis*.

Quelle peut être maintenant l'origine de ces spores qui se mêlent aux aliments des moutons, vaches, chevaux, et leur communiquent le charbon soi-disant spontané? Elles proviennent des produits et des cadavres d'animaux charbonneux. Pasteur, Chamberland et Roux (3) ont pu élucider cette question si importante de l'étiologie des affections charbonneuses dans des séries d'expériences tout à fait remarquables. Lorsqu'on enterre un animal mort du charbon, il se répand sur la terre environnante du sang ou d'autres liquides contenant des Bactéries du charbon en abondance; ces cellules, pouvant se trouver dans de bonnes conditions d'aération et de température, vont donner des spores dont Pasteur a pu, du reste, constater la présence dans la terre recouvrant des fosses d'animaux charbonneux, enterrés, dans un cas, depuis douze ans. En soumettant l'eau de lévigation de cette terre à une température de 90° pendant vingt minutes, il tue tous les germes qu'elle contient, à part les spores du *Vibrion septique* et de la *Bactérie du charbon*, s'il en existe. Les animaux inoculés, dans les cas positifs, meurent, soit du charbon, soit de la septicémie. Pasteur a ainsi pu démontrer la présence de spores charbonneuses dans la couche superficielle de fosses où avaient été enfouis des animaux charbonneux plusieurs années auparavant, et démontrer ainsi directement la longévité et la résistance extraordinaire de ces corps reproducteurs. Pour lui, en outre, les spores formées dans la terre autour du cadavre, avant que la putréfaction vienne tuer les Bactéries, pourraient être ramenées à la surface par les Vers de terre qui avalent, dans les profondeurs du sol, des parcelles de terre pour en retirer les substances nutritives qu'elles contiennent et les rendent à la surface sous forme de petits cylindres diversement

(1) Koch, Zur Aetiologie der Milzbrandes (*Mitth. aus dem kaiserl. Gesundheitsamte*, I, 1881, p. 40), et : Koch, Gaffky et Loeffler, Experim. Studien über Milzbrandinfection durch Fütterungen (*Ibid.*, II, 1884, p. 147).

(2) Buchner, Versuche über die Entstehung der Milzbrandes durch Eineathmung (*Naegeli's Untersuch. über niederen Pilze*. München, 1882, p. 178).

(3) Pasteur, Chamberland et Roux, Sur l'étiologie du charbon (*C. R. de l'Acad. des sc.*, XCI, 1880, p. 42), et Pasteur, La prophylaxie et l'étiologie du charbon (*Bull. de l'Acad. de méd.*, IX, 1880, p. 1138).

contournés. Il a en effet déterminé des cas de charbon typique en inoculant à des cobayes de ces petits cylindres vermiculés, produits par des Vers élevés dans de la terre qui avait été arrosée par des cultures virulentes. De nouvelles expériences de V. Feltz (1) sont venues confirmer ces résultats importants. Ces spores peuvent contaminer sur place ou être emportées au loin par les eaux de pluie ou de ruisseau, et transporter ainsi l'affection dans des endroits où n'ont jamais été enfouis d'animaux charbonneux. Heim (2) donne les coléoptères nécrophages comme pouvant remplir le même rôle. Diatroptoff (3) dit avoir isolé le *Bacille du charbon virulent* de la vase d'un puits d'une ferme où régnait la fièvre charbonneuse. Toutes ces chances de contamination sont considérablement multipliées lorsque les cadavres sont abandonnés à la surface du sol ou enfouis à une faible profondeur et déterrés aussitôt par les carnassiers, chose malheureusement trop fréquente dans les campagnes. Les spores charbonneuses résistent très longtemps aux causes de destruction. D'après Sirena et Scagliosi, on les retrouve vivantes dans la terre sèche ou humide après deux à trois ans, dans l'eau après dix-sept mois, dans le purin après quinze mois. Hochstetter en a retrouvé de virulentes dans l'eau après six mois.

Le charbon par contamination interne, si fréquent chez les animaux, est, par contre, rare chez l'homme, où le point de pénétration du virus est d'habitude le tégument externe lésé. La première manifestation de l'infection de l'organisme est alors une lésion purement locale (4). C'est d'abord une petite tache rouge donnant une vésicule brunâtre, qui s'ouvre et montre une ulcération rouge livide; les parties environnantes se tuméfient; les douleurs sont sourdes et peu accusées. Trois ou quatre jours après l'apparition de la première tache, la fièvre apparaît, indiquant la généralisation de l'infection. L'état général devient très grave et la mort arrive; à l'autopsie, on trouve des Bacilles dans le sang et dans tous les organes (5). Ou bien un mieux survient, l'escarre se limite et est éliminée peu à peu, la guérison se fait lentement. C'est l'affection charbonneuse décrite sous le nom de *pustule maligne*. Cette affection s'observe surtout dans les contrées où règnent les épizooties charbonneuses et chez les individus maniant les dépouilles d'animaux charbonneux : bergers, bouchers, tanneurs, travailleurs des peaux, des laines ou des poils, etc. L'inoculation se fait par le contact de produits virulents avec des solutions de continuité de la peau, blessures ou simples éraillures. Les Mouches à trompe piquante, les *Taons*, les *Asiles* surtout, même les *Stomoxes* qui ressemblent beaucoup à la Mouche ordinaire, peuvent assurément servir à transporter le virus en allant piquer l'homme après s'être repus de sang d'animaux charbonneux, s'il est resté après leur trompe des bâtonnets ou des spores; mais ce mode de contagion doit

(1) Feltz, Sur le rôle des Vers de terre dans la propagation du charbon et sur l'atténuation du virus charbonneux (*C. R. de l'Acad. des sc.*, XCV, 1882, p. 859).

(2) Heim, Rôle des coléoptères dans la dissémination du charbon (*Soc. de Biol.* 2 février 1894).

(3) Diatroptoff, Bactéries charbonneuses dans la vase du fond d'un puits (*Ann. de l'Inst. Pasteur*, VII, 1893, p. 286).

(4) Straus, Contribution à l'anatomie pathologique de la pustule maligne (*Ann. de l'Inst. Pasteur*, I, 1887, p. 429).

(5) Marco del Pont, Contribucion al estudio del carbonclo visceral del hombre. Buenos-Ayres, 1909.

être de beaucoup le plus rare, si tant est qu'il existe. Le malade invoque bien souvent une piqûre, mais tout au début la pustule est prurigineuse, le malade se gratte et s'écorche ; il croit que la petite papule initiale a été produite par une piqûre d'insecte.

Mais il existe aussi chez l'homme un véritable *charbon interne*, où l'infection peut se faire, comme pour le *sang de rate* du mouton, la *fièvre charbonneuse* de la vache, par la voie intestinale. Et la principale cause de cette manifestation est l'usage de la viande d'animaux charbonneux, qui est malheureusement encore maintenant, dans bien des endroits, regardée comme tout à fait inoffensive. Ce charbon interne (*mycose intestinale*) est fréquent dans certaines contrées et d'ordinaire assez rapidement mortel ; on signale cependant quelques cas plus bénins qui se sont terminés par guérison, mais c'est l'exception (1). Enfin la voie d'entrée chez l'homme peut être l'appareil respiratoire, comme dans les expériences de Büchner citées plus haut. C'est sans doute l'origine des cas de charbon interne si fréquents chez les trieurs de laine (2) (*charbon broncho-pulmonaire*, *maladie des trieurs de laine*), chez les ouvriers qui manient les cornes ou les crins pouvant provenir d'animaux charbonneux, et de certains cas de l'affection complexe, se rapprochant plutôt des septicémies produites par d'autres Bactéries, connue sous le nom de *maladie des chiffonniers* (3) ; les ouvriers exerçant ces professions sont en effet très exposés à absorber des spores de *Bacillus anthracis* avec les poussières qu'ils respirent. Dans ces cas de charbon interne, où le pronostic paraît devoir être toujours fatal, la sérothérapie donnerait probablement des résultats, si elle était appliquée assez tôt, c'est-à-dire si le diagnostic était assez rapidement établi. Elle devrait parfois être employée préventivement.

Dans ces diverses formes d'infection, c'est principalement la spore virulente qui intervient. Cette spore garde en effet longtemps sa vitalité et sa virulence, comme le démontrent bien des expériences, celles de Pasteur, tout d'abord. D'après Sirena et Scagliosi (4), les spores charbonneuses résisteraient pendant deux à trois ans dans de la terre humide ou sèche, pendant dix-sept mois dans l'eau de boisson, pendant quinze mois dans le purin ; Pasteur en a retrouvé de vivantes dans de la terre où avaient été enfouis des cadavres d'animaux charbonneux douze et vingt ans auparavant.

D'après des expériences de Feltz (5), il pourrait se produire une atténuation sensible de la virulence après un séjour dans la terre ; la Bactérie ne tuerait plus le lapin, qu'elle vaccine toutefois, mais ferait encore périr le cobaye.

Parmi les causes qui peuvent atténuer et faire disparaître le *Bacille du charbon* dans le milieu extérieur, se trouvent toutes les causes générales d'abord, lumière et oxygène surtout, puis certaines causes particulières intéressantes à connaître, principalement l'*antagonisme microbien*.

(1) Tavel, *Correzpondenzbl. für Schweizer Aertze*, 15 juillet 1887.

(2) Lodge, La maladie des trieurs de laine (*Arch. de méd. expér.*, 1890, p. 759).

(3) Paltauf, Zur Aetiologie der Hadernkrankheit (*Wiener. klin. Wochenschr*, 1888, nos 18, 26). — Eppinger, Pathologische Anatomie und Pathogenesis der sogenannten Hadernkrankheit (*Ibid.*, 1888, nos 37, 38).

(4) Sirena et Scagliosi, *La Riforma medica*, 1894, n° 104.

(5) Feltz, Expériences démontrant que dans certaines conditions le virus charbonneux s'atténue dans la terre (*C. R. de l'Acad. des sc.*, CII, 1886, p. 132).

Il existe, en effet, un véritable antagonisme entre cette Bactérie et d'autres espèces microbiennes qui peuvent facilement se rencontrer en connivence avec elle. C'est d'abord et surtout le *Bacille pyocyanique*, comme l'ont bien démontré les expériences de Bouchard (1), confirmées de nombreuses fois depuis. Dans des cultures mixtes en bouillon, le *Bacille pyocyanique* se développe absolument seul ; le *Bacille du charbon* est tué. D'un autre côté, les lapins et les cobayes résistent souvent, pas toujours, lorsqu'on leur inocule successivement du *Bacille du charbon* et du *Bacille pyocyanique*; on peut arriver au même résultat en employant le filtrat de culture de ce dernier microbe. Le fait est bien dû à la production de la pyocyanase qui jouit de propriétés bactériolytiques marquées. On a proposé de l'appliquer au traitement du charbon humain (2).

D'autres microbes agissent dans le même sens. Le *Streptocoque* d'abord; le *Staphylocoque doré* également, mais seulement en cultures, pas *in vivo*. Le *Pneumocoque* agit comme ce dernier. Le *Pneumobacille* paraît nettement antagoniste dans tous les cas. Les ferments lactiques pourraient faire disparaître le *Bacille du charbon*, dans le lait non stérilisé par exemple; certains microbes putrides feraient de même.

Les belles recherches de Pasteur ont prouvé avec la dernière évidence quels sont les résultats auxquels on est en droit de s'attendre pour la prophylaxie des maladies charbonneuses de l'homme et des animaux, en mettant à profit les faits acquis. L'enfouissement profond des cadavres d'animaux charbonneux est nécessaire; leur incinération complète devrait être obligatoire, et aussi la désinfection la plus parfaite possible, au moins à l'eau bouillante, des parties souillées de sang, de liquides organiques ou de déjections. La consommation de la viande charbonneuse doit être sévèrement prohibée. Elle se reconnaît facilement à ses caractères bien spéciaux (3). Les muscles sont d'une couleur brun rouge pâle, parfois un peu jaunâtre ; ils ont un aspect lavé, souvent presque rose-saumon. Le tissu en est mou, friable; ils laissent écouler à la coupe un sang noir, visqueux, tachant les doigts en brun rouge, se coagulant très lentement et gardant sa teinte foncée à l'air. De plus, cette viande se putréfie bien plus rapidement et peut alors déterminer des accidents septicémiques. Nous avons vu que le lait des vaches charbonneuses peut aussi être virulent. Les autorités sont suffisamment armées par la législation ; toute négligence de leur part est coupable.

RECHERCHE ET DIAGNOSTIC

Chez l'homme, dans le cas de pustule maligne, la sérosité de la pustule montre en grande abondance des *Bacilles du charbon* bien évidents. Dans le cas de charbon interne, le sang, surtout le sang du cœur, en offre le plus souvent.

Chez l'animal, l'examen microscopique du sang lèvera le plus souvent tous les doutes.

(1) Bouchard, *Acad. des sc.*, 8 avril 1889.

(2) Fortineau, Traitement du charbon par la pyocyanase (*Ann. de l'Inst. Pasteur*, XXIV, 1910, p. 955).

(3) Macé, Les substances alimentaires étudiées au microscope surtout au point de vue de leurs altérations et de leurs falsifications. Paris, J.-B. Baillière, 1891, p. 100.

Lorsque la mort date de quelque temps, on rencontre souvent dans le sang d'autres Bactéries qui peuvent prêter à confusion, surtout du *Vibrion septique*, diverses espèces des putréfactions. L'aspect tout spécial des *Bacilles du charbon* dans les préparations colorées, indiqué page 655, fera aisément reconnaître ces derniers ; c'est un des caractères que l'on devra toujours chercher en premier lieu.

Enfin les cultures, bien caractéristiques, et l'inoculation au cobaye, que l'on peut prendre comme réactif du charbon, permettront souvent de poser un diagnostic assuré.

Burri (1), puis Hartleb et Stutzer (2) ont signalé, sous le nom de *Bacillus pseudanthracis*, dans des poudres de viandes, un Bacille semblable morphologiquement au *Bacillus anthracis*, mais dépourvu de toute virulence. Il en est de même du *Bacillus anthracis similis* rencontré dans le pus d'un abcès par Mac Farland (3), dont les cultures étaient absolument identiques. Ce sont peut-être des microbes voisins ou du vrai *Bacillus anthracis* dépourvu de toute virulence, devenu simple saprophyte. Les cultures de terre ou d'eau donnent parfois de semblables espèces, tels le *Bacillus anthracoides* de Hueppe et Cartwright Wood (4), qui ne différerait du *Bacillus anthracis* que par un manque absolu de virulence, ou celui de Zikes (5), tout à fait dépourvu de virulence, donnant un voile sur le bouillon, y produisant un peu d'indol et pas du tout d'hydrogène sulfuré. Quelques détails seront donnés plus loin sur ces microbes qui paraissent être plutôt de vrais types de saprophytes, distincts de l'espèce pathogène.

Sérodiagnostic. — Les Bacilles des cultures se prêtent difficilement à l'étude de l'agglutination, parce qu'ils sont d'ordinaire accolés les uns aux autres ou unis en filaments. Les éléments des cultures de premier vaccin charbonneux de Pasteur se dissocient très aisément et conviennent alors mieux pour ces observations. Lambotte et Maréchal (6) ont remarqué que le sérum du sang humain normal agglutinait très fortement les émulsions de telles cultures, de sorte qu'il devient difficile de compter sur le sérodiagnostic dans ces conditions ; l'agglutination se produirait encore à 1 p. 500, avec le sérum de certains sujets. Le sérum du rat, du cobaye, du chien, de la chèvre, du lapin, du bœuf et du cheval n'est pas doué d'un pouvoir agglutinant aussi considérable ; le maximum ne dépasse pas 1 p. 50. Les sérums d'animaux immunisés n'ont pas de pouvoir agglutinant plus fort que beaucoup de sérums normaux.

(1) Burri, *Hygienische Rundschau*, 1894, n° 7.

(2) Hartleb et Stutzer, Das Vorkommen von Bacillus pseudanthracis im Fleischfuttermehl (*Centralbl. für Bakt.*, 2te Abth., III. 1897, p. 81).

(3) Mac Farland, Bacillus anthracis similis (*Centralbl. für Bakt.*, XXIV, 1898, p. 556).

(4) Hueppe et Wood, *Berl. klin. Wochenschr.*, 1889, n° 16.

(5) Zikes, Beitrage zum Vorkommen milzbrandähnlicher Bakterien im Leitungswasser (Ref. in *Centralbl. für Bakt.*, XXXII. 1902, Referate, p. 389).

(6) Lambotte et Maréchal, L'agglutination du Bacille charbonneux par le sang humain normal (*Ann. de l'Inst. Pasteur*, XIII, 1899).

BACILLUS TUBERCULOSIS Koch.

(*Bacille de la tuberculose, Bacille de Koch.*)

ATLAS DE MICROBIOLOGIE, PL. I ET II.

La découverte, par Villemin (1), de l'inoculabilité du tubercule, sur laquelle il a basé la théorie de la contagiosité de la tuberculose, rendait très probable la présence, dans les matières virulentes, d'un agent infectieux de nature bactérienne. Cette théorie, qui fut l'objet au début d'une opposition si soutenue, reçut une confirmation éclatante lors de la découverte par Robert Koch (2) du *Bacille de la tuberculose* et de l'étude magistrale qu'il fit de ses propriétés. La grande difficulté de distinguer ces Bactéries, très petites et tout à fait transparentes, des liquides ou des tissus de même réfringence qu'elles, et l'impossibilité où l'on se trouvait de les différencier d'autres inoffensives, très fréquentes dans les crachats surtout, étaient de grands problèmes que Koch est parvenu à résoudre, tout à son honneur, à force de science et de travail soutenu. Il est d'abord parvenu à les colorer, en soumettant les préparations à l'action d'un bain colorant alcalinisé (Voy. p. 375), beaucoup plus actif que les solutions aqueuses simples qui, jusque-là, n'avaient donné aucun résultat. Il fit plus ; en mettant à profit la propriété inverse et corrélative que possèdent ces Bacilles de retenir la couleur bien plus longtemps que la plupart des autres et de ne la céder qu'après une action prolongée du réactif décolorant, il a pu leur conserver, dans une préparation complexe, une nuance donnée et teindre d'une couleur de fond différente les éléments divers et les autres Bactéries contenus dans la substance examinée (Voy. p. 387). Restait à prouver que ces organismes rencontrés dans les produits tuberculeux de l'homme et des animaux, surtout dans la *pommelière* de la vache, étaient la cause réelle de l'affection et l'origine du contage. Koch l'a fait en isolant cette Bactérie, en obtenant des cultures pures et en reproduisant la maladie typique par inoculation de ces cultures. La méthode suivie par Koch a été perfectionnée depuis par de nombreux observateurs dont les travaux ont fait de la recherche du *Bacille de la tuberculose* un des points essentiels du diagnostic de la tuberculose, surtout au début, alors que les symptômes ordinaires sont peu prononcés ou peuvent faire défaut et alors qu'un traitement bien institué a des chances beaucoup plus nombreuses d'amener des résultats favorables.

Koch traitait les coupes de tissus et les lamelles préparées en étendant des crachats ou d'autres liquides en une mince couche à la surface, séchant et fixant par trois passages dans la flamme, par un bain colorant alcalin, préparé (Voy. p. 375) en mélangeant :

Solution alcoolique concentrée de bleu de méthylène..	1 volume.
Solution de potasse à 10 p. 100........................	2 volumes.
Eau distillée..	200 —

(1) VILLEMIN, Causes et nature de la tuberculose (*Bull. de l'Acad. de méd.*, XXXII, 1886, p. 152 et 897), et Études sur la tuberculose. Paris, 1868, J.-B. Baillière.

(2) KOCH, Die Aetiologie der Tuberculose (*Mitth. aus dem kaiserl. Gesundheitsamte*, II, 1884, p. 1).

Les préparations devaient séjourner un jour dans la solution froide ou quelques heures seulement en chauffant à 40° ou 50°. En plongeant alors les préparations dans une solution aqueuse concentrée de vésuvine, on observe qu'au bout d'un quart d'heure environ la couleur brune s'est substituée à la teinte primitive bleue dans tous les éléments retenant faiblement la couleur, tandis qu'elle persiste sur les *Bacilles tuberculeux*, dès lors très facilement reconnaissables, colorés en bleu sur un fond d'éléments bruns. La réaction était d'autant plus caractéristique que, d'après les recherches de Koch, aucune autre Bactérie ne se comportait de la sorte, excepté toutefois le *Bacille de la lèpre*, que d'autres particularités peuvent du reste faire aisément distinguer.

Les nombreuses recherches ultérieures n'ont fait que confirmer et étendre les importantes découvertes de Koch. En raison de la part considérable et toujours croissante, semble-t-il, qu'elle prend dans le monde vivant, la tuberculose est une des maladies microbiennes qui, de notre temps, ont attiré et attirent le plus les chercheurs et ont suscité le plus de travaux. On trouvera l'exposé fidèle et une critique savante de tout ce qui a été écrit d'important sur ce sujet dans une belle monographie publiée par Straus (1) en 1895, et dans l'excellent opuscule de Nocard (2).

La tuberculose s'attaque à pas mal d'espèces vivantes, l'homme, les mammifères et les oiseaux d'un côté, des animaux à sang froid de l'autre.

Tuberculose humaine et tuberculose bovine. — Les premières recherches de Koch l'avaient conduit à admettre l'identité de la *tuberculose humaine* et de la *tuberculose bovine*, de beaucoup la plus importante parmi les tuberculoses des mammifères. La plupart des expérimentateurs s'étaient rangés à cet avis. Il existe en effet dans la science de nombreux exemples qui démontrent la transmission à l'homme d'une tuberculose typique à la suite d'inoculation accidentelle de produits virulents provenant de bovidés tuberculeux. D'un autre côté, des expériences prouvent la possibilité de contagionner les bovidés avec des produits tuberculeux humains. Dès 1868, Chauveau annonçait qu'on pouvait transmettre la tuberculose à des veaux en leur faisant ingérer des produits tuberculeux de source humaine. Sidney Martin (3) avait cependant signalé en 1899 des différences importantes dans l'action sur les veaux des produits tuberculeux de l'homme et du bœuf, les produits bovins déterminant régulièrement une infection tuberculeuse caractéristique, les produits humains ne donnant souvent rien ou simplement de petites lésions locales.

La question semblait tranchée en faveur de l'identité complète, lorsqu'en 1901, au Congrès de Londres, Koch (4) s'est élevé contre cette conception uniciste et est venu affirmer que la tuberculose humaine différait entièrement de celle des bovidés et, en particulier, n'était pas transmissible à ces derniers. Il se basait sur des expériences faites en

(1) Straus, La tuberculose et son Bacille, 1895.

(2) Nocard, Les tuberculoses animales, 1894 (*Encyclopédie Léauté*, G. Masson).

(3) Sidney-Martin, Royal Commission on Tuberculosis, 1895.

(4) Koch, Die Bekämpfund der Tuberkulose (*Deutsche med. Wochenschr.*, 1901, n° 33).

collaboration avec Schütz (1), dans lesquelles des essais d'infection de veaux par des voies diverses, ingestion, inhalation, injections sous-cutanées, intrapéritonéales ou intraveineuses, à l'aide de produits virulents de provenance humaine, n'avaient donné aucun résultat positif, alors que l'inoculation de produits virulents de provenance bovine occasionnait toujours une généralisation tuberculeuse. La conclusion à tirer était que le Bacille humain ne peut pas infecter le bœuf et, par réciproque, que le Bacille bovin ne peut pas infecter l'homme, est sans danger pour lui. D'où, particulièrement, l'inutilité des mesures sanitaires concernant le lait et la viande qui proviennent de bovidés tuberculeux, renfermant des Bacilles bovins. On le voit, c'est gros de conséquences. Pour Koch, le Bacille humain et le Bacille bovin constituaient donc des espèces tout à fait différentes.

Il y a du vrai dans l'opinion de Koch, mais l'interprétation qu'il donne des faits observés est certainement beaucoup trop catégorique. La distinction du Bacille bovin et du Bacille humain est loin d'être fondamentale.

Tout d'abord, la virulence du Bacille humain pour les bovidés est loin d'être nulle; elle est faible, mais réelle, et parfois très marquée. C'est ce que prouvent de nombreuses expériences de Nocard (2), d'Arloing (3), de la Commission anglaise de la tuberculose (4), même de la Commission allemande de l'Office impérial de santé (5). Il est bien acquis que le Bacille humain peut déterminer chez les bovidés une véritable infection tuberculeuse avec lésions habituelles. On a même, sur ce point, beaucoup d'exemples de résultats très positifs avec des inoculations faites en séries. Eber (6) a démontré, en outre, que, par des passages successifs chez les bovidés, le Bacille humain peut acquérir une grande virulence et se comporter tout à fait comme le Bacille bovin à la fois chez le veau, chez le lapin et en cultures; il a de plus observé tous les intermédiaires et tous les passages entre le Bacille humain et le Bacille bovin bien marqués.

D'un autre côté, l'homme peut être infecté par le Bacille bovin. On a de nombreuses observations de contaminations accidentelles, aboutissant à une généralisation tuberculeuse, particulièrement chez des bouchers, des vétérinaires, d'infection probable par la consommation de lait provenant de vaches tuberculeuses.

Il ne paraît donc pas qu'on puisse faire des Bacilles tuberculeux trouvés chez l'homme et de ceux trouvés chez les bovidés deux espèces distinctes. Il existe entre eux des différences marquées, c'est vrai, mais

(1) Koch et Schuetz, Menschliche Tuberkulose und Rindertuberkulose (*Arch. für wiss. und prakt. Thierheilk.*, 1902, p. 169).

(2) Nocard, *Loc. cit.*, p. 679.

(3) Arloing, L'étiologie de la tuberculose (*XIVe Congr. internat. d'hygiène*. Berlin. 1907).

(4) Royal, Commission appointed to inquire into the relations of human and animal tuberculosis. Londres, Eyre and Spottiswoode, 1er rapport, 1904; 2e rapport, 1907.

(5) Kossel, Weber et Heuss, Vergleichende Untersuchungen über Tuberkelbacillen verschiedener Herkunft (*Tuberkulose Arbeiten aus dem Kaiserl. Gesundheitsamte*, Berlin, 1904 et 1905).

(6) Eber, Experimentelle Uebertragung der Tuberkulose von Menschen auf das Rind (*Beitr. zur klin. der Tuberk.*, III, 1905). — Die Unwandlung von Menschen stammender Tuberkelbacillen (*Münch. med. Wochenschr.*, 1910, p. 115).

ces différences peuvent très bien être rapportées à l'adaptation à des conditions de vie différentes. Cette adaptation au milieu a produit ici deux races ou deux types, le *type humain* et le *type bovin*, simples variétés d'une espèce qui est une, se différenciant par des caractères assez nets, mais pouvant quand même passer de l'une à l'autre dans des conditions déterminées.

Les différences que présentent ces deux types sont d'ordres divers. Les Bacilles bovins sont souvent plus courts, plus épais, plus irréguliers, moins souvent incurvés; mais ces caractères sont sujets à de très grandes variations. Leurs cultures sont souvent plus minces, plus sèches, moins abondantes ; on trouve à cela de nombreuses exceptions et bien des cultures de Bacilles bovins ne peuvent sous ce rapport se distinguer de cultures de Bacilles humains. La virulence des Bacilles bovins est plus grande que celle des Bacilles humains; c'est le cas le plus habituel, mais cette virulence est loin d'être identique pour tous les échantillons de Bacilles bovins, beaucoup l'ont nettement amoindrie; d'un autre côté, il est des Bacilles humains à virulence élevée. Comme il a été dit plus haut, à tous ces points de vue on trouve de nombreux termes de passages qui conduisent graduellement d'un type à l'autre.

Le Bacille humain paraît être bien réellement un type à virulence amoindrie ; l'homme peut, du reste, être considéré comme relativement résistant à la tuberculose, beaucoup d'animaux, le cobaye, les bovidés par exemple, étant beaucoup plus sensibles que lui.

Les Bacilles bovins ont, pour la plupart des autres mammifères, une virulence plus grande que les Bacilles humains. Le cobaye est à peu près également sensible aux deux. Le lapin est beaucoup moins sensible à la tuberculose humaine qu'à la tuberculose bovine ; il peut aisément servir à leur distinction, quoique moins nettement que le veau.

Les Bacilles tuberculeux des autres mammifères paraissent identiques aux Bacilles bovins, s'en écartant plus ou moins par quelques caractères d'importance toute secondaire.

Tuberculose aviaire. — La question de la *tuberculose aviaire* dans ses rapports avec la tuberculose humaine et bovine est encore plus discutée.

La présence de tubercules, la tuberculose anatomiquement caractérisée par ces lésions, est connue depuis longtemps chez les oiseaux, tout particulièrement chez les gallinacés domestiques où tous sont d'accord pour admettre sa grande fréquence.

Koch (1), le premier, constata la présence du *Bacille de la tuberculose* dans les lésions du foie et de l'intestin de poules et de faisans tuberculeux. Il ne mit pas en doute son identité avec celui de la tuberculose de l'homme.

De nombreux observateurs signalaient des ressemblances certaines entre les Bacilles trouvés dans la tuberculose de l'homme et des mammifères et ceux de la tuberculose des oiseaux, des poulets principalement. On citait des observations où des poules semblaient s'être infectées en ingérant des crachats d'un phtisique; Nocard avait, comme

(1) Koch, Die Aetiologie der T. (*Loc. cit.*, p. 678).

Koch, pu rendre tuberculeuses des poules en leur faisant avaler des produits tuberculeux de mammifères. H. Martin (1) n'avait cependant obtenu aucun résultat en faisant absorber à des poules, des coqs, un pigeon, des lésions de tuberculose humaine.

Plus tard, d'autres nombreuses expériences démontrant, à l'appui de celles de H. Martin, que les poules nourries pendant longtemps de crachats de phtisiques ne devenaient jamais tuberculeuses, Straus et Gamaléia (2) concluent à une séparation bien nette des microbes, en se basant principalement sur deux séries de caractères l'apparence des cultures sur certains milieux et les effets des inoculations expérimentales. On peut résumer les différences qu'ils citent dans les cinq propositions suivantes :

1° Les cultures de la tuberculose humaine sont sèches, écailleuses ou verruqueuses ; celles de la tuberculose aviaire sont humides, grasses, plissées et molles ;

2° Le Bacille de la tuberculose humaine ne pousse guère au-dessus de 41°, pas du tout à 43° ; celui de la tuberculose aviaire pousse rapidement et abondamment à cette température ;

3° L'inoculation au cobaye et au lapin du Bacille de la tuberculose humaine détermine l'apparition de tubercules dans le poumon, le foie et la rate. Celle du Bacille de la tuberculose aviaire les tue sans lésions apparentes ; il y a infiltration tuberculeuse des organes ;

4° Le chien est infesté facilement avec la tuberculose humaine ; il jouit d'une immunité très grande à l'égard de la tuberculose aviaire ;

5° Les poules sont tout à fait réfractaires à la tuberculose humaine.

On a pu répondre, mais en partie seulement, à ces objections.

Pour la première, depuis l'emploi de milieux glycérinés pour les cultures, il est amplement démontré qu'au bout de quelques séries de cultures le Bacille de la tuberculose humaine peut prendre tous les caractères que l'on donne comme spéciaux à la tuberculose aviaire. Ceux-là mêmes deviennent ses caractères habituels ; la forme sèche, écailleuse ou verruqueuse, devient rare. Les superbes cultures qui sont sorties du laboratoire de Nocard ont dû convaincre les plus sceptiques. D'un autre côté, la tuberculose aviaire donne parfois des cultures sèches, écailleuses ou verruqueuses, considérées comme spéciales à la première. Fischel (3) dit avoir transformé sous ce rapport de la tuberculose humaine en type aviaire et inversement en faisant des cultures sur l'œuf de poule d'abord, puis sur gélose boriquée. Nocard (4) serait parvenu à donner au Bacille de la tuberculose humaine tous les caractères biologiques et la virulence qui caractérisent le type aviaire, en le cultivant en sacs de collodion dans le péritoine des poules.

Quant à la facilité de végéter à 43°, on peut admettre qu'elle provient

(1) H. Martin, Virulence des microbes tuberculeux (*Études sur la T. publiées par Verneuil*, 1887).

(2) Straus et Gamaléia, Recherches expér. sur la T. humaine et sa distinction de la T. des oiseaux (*Arch. de méd. expér.*, III, 1891, p. 457).

(3) Fischel, Der Morphologie und Biologie der Tuberkelbacillus (*Berlin. klin. Wochenschr.*, 1893, n° 41).

(4) Nocard, Sur les relations qui existent entre la T. humaine et la T. aviaire (*Ann. de l'Inst. Pasteur*, XII, 1898, p. 561).

d'une adaptation spéciale du Bacille aviaire à l'organisme de l'oiseau dont la température est plus élevée que celle du mammifère.

La différence des résultats dans l'inoculation des deux types est loin d'être aussi tranchée qu'on l'avait annoncé. Yersin (1) a observé l'infiltration tuberculeuse aussi bien avec la tuberculose d'origine bovine qu'avec la tuberculose aviaire ; Fischel, en se servant de ses cultures de tuberculose humaine modifiée en type aviaire, a aussi obtenu la mort de lapins sans lésions tuberculeuses apparentes. Nocard (2), puis Courmont et Dor (3), Sanchez-Toledo (4), ont déterminé des tuberculoses typiques chez des mammifères avec des cultures de tuberculose aviaire. Cadiot, Gilbert et Roger (5) ont obtenu chez le lapin, avec la tuberculose aviaire, tantôt des lésions tuberculeuses manifestes, tantôt l'infiltration tuberculeuse. Grancher et Ledoux-Lebard (6) obtiennent l'un ou l'autre type chez le lapin, par inoculation intraveineuse, suivant la dose de culture employée ; une dose minime donne une tuberculose à lésions apparentes, une dose plus forte produit l'infiltration tuberculeuse. Des expériences de Richet et Héricourt (7) prouvent que le chien peut présenter une tuberculose classique par inoculation de tuberculose aviaire.

En ce qui concerne la réceptivité de la poule à la tuberculose humaine, Koch a obtenu des tubercules chez plusieurs individus avec des produits tuberculeux humains; Nocard, Cadiot, Gilbert et Roger (8) ont observé des tubercules chez la poule à la suite d'ingestion ou d'inoculation de produits tuberculeux humains ou de cultures de même provenance. Il y a, il est vrai, difficulté assez grande d'arriver au résultat cherché, mais non impossibilité ; ce peut être une simple question d'adaptation à un milieu différent.

Il existe en outre des rapports évidents au point de vue de la formation des produits solubles dans les cultures. Roux a reconnu que la tuberculine obtenue à l'aide de cultures aviaires produit sur l'animal et sur l'homme des effets similaires à ceux que détermine la tuberculine des cultures de tuberculose humaine ou bovine.

On se rend facilement compte que toutes ces explications données, ces réfutations fournies n'ont qu'une valeur relative ; les résultats visés sont lents, souvent difficiles à établir, apparaissent presque toujours plutôt comme des exceptions. Pour Weber et Bofinger (9), qui ont fait une

(1) Yersin, Études sur le développement du tubercule expérimental (*Ann. de l'Inst. Pasteur*, II, 1888, p. 245).

(2) Nocard, Recherches expérimentales sur la T. des oiseaux (*Soc. de Biol.*, 17 octobre 1885).

(3) Courmont et Dor, De la production, chez le lapin, de tumeurs blanches expérimentales par inoculation intraveineuse de Bacilles tuberculeux aviaires atténués (*Soc. de Biol.*, 8 novembre 1890 et 21 février 1891).

(4) Sanchez-Toledo, Transmission de la T. de la mère au fœtus (*Arch. de méd. expér.*, 1889).

(5) Cadiot, Gilbert et Roger, T. des volailles (*Soc. de Biol.*, 11 octobre 1890).

(6) Grancher et Ledoux-Lebard, Étude sur la T. expérimentale du lapin (*Arch. de méd. expér.*, 1891, p. 116). — Id., T. aviaire et humaine (*Ibid.*, 1892, p. 1).

(7) Richet et Héricourt, *Études expér. et clin. sur la T. publiées par Verneuil*, II, 1890.

(8) Cadiot, Gilbert et Roger, Inoculation aux gallinacés de la T. des mammifères (*Soc. de Biol.*, 25 juillet 1891).

(9) Weber et Bofinger, Die Hühnertuberkulose (*Tuberkulose Arbeiten aus dem Kaiserl. Gesundheitsamte*, I, 1904, p. 83).

excellente étude de la question, ils sont loin d'avoir réellement la valeur qu'on a voulu leur attribuer. En particulier, l'infection de la poule avec un véritable Bacille tuberculeux humain ou bovin reste toujours douteuse ; la tuberculine aviaire, bien moins active que la tuberculine bovine ou humaine, ne serait en rien comparable à ces dernières.

La tuberculose des oiseaux n'est du reste pas toujours due à la tuberculose aviaire, mais souvent à une infection par le Bacille humain ou bovin ; et le perroquet (1), très sensible à la tuberculose humaine et bovine, beaucoup plus qu'à l'aviaire, n'a jamais transformé les premières en tuberculose aviaire.

La question de la *tuberculose des vertébrés à sang froid* est encore trop peu élucidée pour qu'il soit possible d'être nettement affirmatif à son égard (Voy. p. 748). Il se pourrait qu'il n'y ait pas de différences primordiales, mais simplement des variations de degré secondaire, qui peuvent raisonnablement être mises sur le compte d'une adaptation à un milieu tout autre, produisant alors un type spécial, le *Bacille pisciaire*.

Il faut enfin parler aussi de ces microbes, paraissant être de simples saprophytes ressemblant aux précédents par d'importants caractères, ceux de coloration principalement, ce qu'on peut dénommer l'acido-résistance, puis parce que parfois leur inoculation donne de véritables tubercules, microbes qui peuvent même parfois accompagner le *Bacille de la tuberculose* dans des lésions tuberculeuses. On peut les dénommer *Bacilles pseudo-tuberculeux* ou *paratuberculeux* à cause de ces rapports, ou les désigner sous le nom de *Bacilles acido-résistants* ; leur étude sera faite plus loin (p. 775). Il est difficile et peut-être téméraire actuellement d'affirmer leur identité avec le *Bacille de la tuberculose* et d'assurer qu'ils en représentent le type saprophyte ; mais il n'est quand même pas possible de rejeter complètement cette opinion.

La conclusion que l'on peut tirer de cet exposé est qu'il paraît rationnel de penser qu'il existe un *Bacille de la tuberculose* comme véritable espèce microbienne, qui peut, suivant surtout les conditions d'existence et d'habitat, présenter des variations assez grandes, variétés ou races, même *types*, comme on voudra, s'écartant plus ou moins du type normal. Ce type normal pourrait être le Bacille bovin. Il en existerait surtout une variété assez proche, le Bacille humain ; une assez éloignée, le Bacille aviaire ; une beaucoup plus éloignée encore, le Bacille des animaux à sang froid ; et, près de cette dernière, des Bacilles paratuberculeux, les uns jouissant d'un certain pouvoir infestant, les autres devenus de purs saprophytes, avec tous les intermédiaires voulus dans cette gradation.

Ou bien alors ces types seraient tout à fait indépendants les uns des autres. Les Bacilles bovin et humain auraient peut-être quelques rapports ; le Bacille aviaire serait une espèce tout à fait distincte, de même que le Bacille des vertébrés à sang froid, *Bacille pisciaire* ; les autres Bacilles acido-résistants constitueraient aussi des espèces à part. Tous ces types auraient pu cependant se différencier d'un type ancestral unique, saprophyte.

La spécificité du microbe étant admise, les lésions observées sont-elles également spécifiques, pathognomoniques ? On l'a cru longtemps,

(1) Straus, Sur la T. du perroquet (*Arch. de méd. expér.*, 1896, n° 1).

admettant que le tubercule était l'expression de l'infection tuberculeuse. Il faut reconnaître que non ; le tubercule n'est que l'expression d'une réaction de l'organisme contre certaines irritations. Il y a des affections à tubercules qui ne sont nullement sous la dépendance du *Bacille de la tuberculose* ; il sera parlé plus loin des *pseudo-tuberculoses* qui peuvent être dues à des organismes bien différents, à d'autres Bactéries, à des Champignons inférieurs, à des Protozoaires, à des œufs d'Helminthes, voire même à des poussières inertes. Dans la tuberculose bacillaire, de beaucoup la plus commune, l'agent de l'irritation est le Bacille.

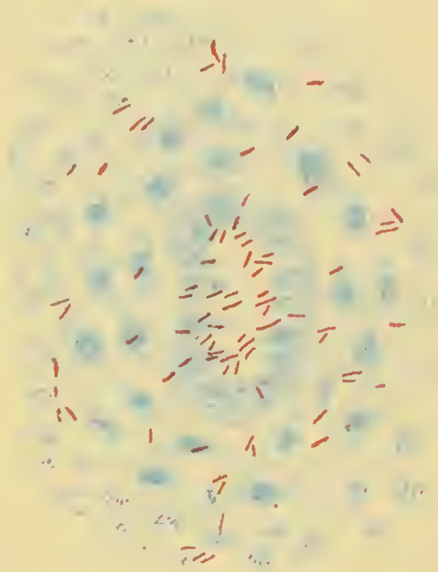


Fig. 255. — Follicule tuberculeux ; stade de début (demi-schématique). Au centre, cellule géante avec nombreux Bacilles ; autour, cellules épithélioïdes et cellules lymphoïdes plus petites. Environ 800/1.

Le Bacille pénètre dans un tissu, apporté du point d'inoculation par un globule blanc qui a suivi la voie lymphatique ou sanguine. Le leucocyte se fixe et se détruit en mettant en liberté le ou les Bacilles qu'il contient. Il se forme autour d'eux, par diapédèse, une agglomération leucocytaire donnant autour des Bacilles qui se sont multipliés un petit nodule, premier rudiment du tubercule. Les éléments du nodule et aussi des cellules voisines du tissu envahi subissent la transformation épithélioïde ; à la partie centrale se trouvent une ou plusieurs *cellules géantes* (fig. 255), éléments de grande taille à nombreux noyaux ; on les considère tantôt comme des éléments formés par un ou plusieurs leucocytes devenus confluents, en voie de dégénérescence et de nécrobiose, où les noyaux continueraient seuls à se diviser ; tantôt, au contraire, avec Metschnikoff (1), comme des éléments très actifs, de véritables phagocytes, luttant contre le *Bacille tuberculeux*. C'est surtout dans les cellules géantes que se trouvent alors les Bacilles, et souvent en grand nombre. Le tubercule se trouve constitué. Il évolue suivant deux directions. Ses éléments peuvent se transformer en un tissu fibreux qui détermine en quelque sorte l'enkystement du produit virulent, et peut l'isoler complètement ; cette production du *tubercule fibreux*, *granulation fibreuse*, est un processus favorable, de guérison. Ou bien, au contraire, les éléments du nodule subissent une sorte de dégénérescence vitreuse ou colloïde, se nécrosent et se transforment en une matière jaunâtre, la *matière caséeuse*, qui se ramollit sous l'influence des produits sécrétés par le microbe. C'est le *tubercule caséeux*. Les leucocytes des alentours peuvent transporter des Bacilles dans d'autres parties du corps et y provoquer la formation d'autres lésions semblables ; c'est de cette manière que l'infection s'étend dans un même organe, peut gagner d'autres organes, même se généraliser. D'après Maurel (2), les tubercules se développeraient

(1) Metschnikoff, Ueber die phagocytäre Rolle der Tuberkelriesenzellen (*Virchow's Arch.*, CXIII, 1888, p. 63).
(2) Maurel, Histogenèse du tubercule (*Congrès de méd. de Montpellier*, 1898).

exclusivement dans les vaisseaux, aux dépens des leucocytes et des cellules endothéliales.

D'un autre côté, nous l'avons vu précédemment, toute lésion macroscopique fait défaut dans ce qu'on peut nommer l'*infiltration tuberculeuse.*

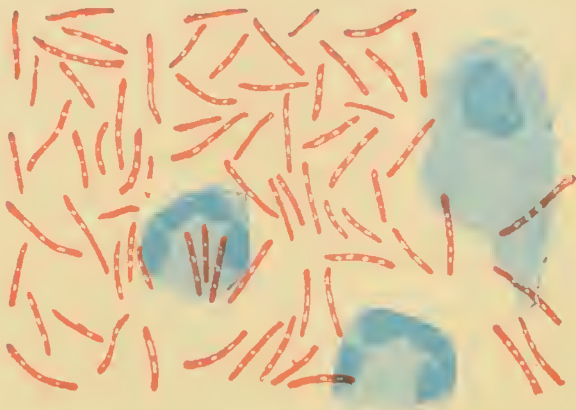


Fig. 256. — Bacilles tuberculeux dans les crachats. Coloration par la fuchsine et le bleu de méthyle. 1500/1.

Il ressort de là que l'infection tuberculeuse peut revêtir, aussi bien chez l'homme que chez l'animal, deux formes différentes. Dans l'une, on constate avec plus ou moins d'évidence la présence de tubercules; c'est la forme bien étudiée par Villemin, d'où le nom de *type Villemin* sous lequel on peut la désigner. Dans l'autre, les lésions macroscopiques font défaut; les organes atteints par le parasite, le foie, la rate surtout, qui sont simplement hypertrophiés et de coloration plus foncée, montrent, entre leurs éléments peu ou pas modifiés, de nombreux Bacilles épars ou des groupes de Bacilles; c'est une sorte de *septicémie tuberculeuse*, une véritable *infiltration tuberculeuse*, non pas dans le sens que Laennec attribuait à cette dénomination, par exemple; on donne à cette forme le nom de *type Yersin*, parce que cet expérimentateur l'a obtenue le premier expérimentalement aussi bien avec le Bacille humain qu'avec le Bacille aviaire.

MORPHOLOGIE

Caractères microscopiques. — Les *Bacilles tuberculeux* vivants, des cultures, sont de petits bâtonnets hyalins, un peu plus épais que ceux des préparations colorées, habituellement immobiles.

Les bâtonnets des préparations colorées (fig. 257) mesurent en longueur moyenne de 1,5 μ à 3,5 μ, du quart à la moitié d'un globule rouge ; il en est qui atteignent jusque 5 μ. La largeur est plus uniforme : elle est d'ordinaire de 0,3 μ et peut arriver à 0,5 μ ; les Bacilles préparés par la méthode de Koch paraissent un peu plus minces que ceux colorés suivant le procédé d'Ehrlich. Ils sont droits ou, plus fréquemment, légèrement courbés (fig. 258), parfois même pliés, d'après Koch. La largeur n'est souvent pas uniforme ; ils présentent parfois une série d'étranglements leur donnant l'apparence de boudins irréguliers, ou même, s'ils sont plus prononcés, d'une chaînette formée d'articles ovoïdes (fig. 259). C'est ce qui explique comment on a pu avancer que ces Bacilles se transformaient à un moment donné en une chaîne de coccus (1). A la suite de l'action des solutions colorantes, on distingue souvent dans le corps même du bâtonnet un nombre variable, quatre à six d'habitude, de vacuoles incolores, de forme ovalaire, que Koch dit être des spores, sans pouvoir toutefois en donner une preuve certaine (fig. 258). D'après

(1) Amann, Die feinere Structur der Tuberkelpilzen (*Schweiz. Wochenschr. für Pharm.*, 1887, n° 15).

lui, l'article qui se prépare à sporuler se divise d'abord en articles courts au nombre de deux au moins et de six au plus, dans chacun desquels apparaît un point brillant qui grandit et donne une spore réfringente.

Cette question de production de spores est encore loin d'être élucidée. Elle a cependant, à bien des points de vue, une importance considérable,

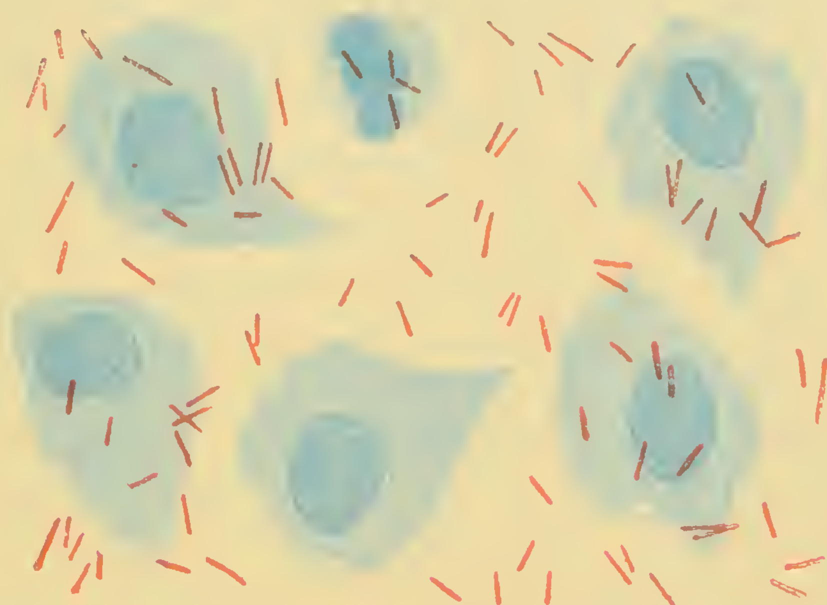


Fig. 257. — Bacilles tuberculeux. Préparation obtenue avec le suc de raclage d'un tubercule. 1500/1 (d'après Baumgarten).

la présence de spores chez une Bactérie comportant la manifestation de propriétés spéciales, en particulier une résistance souvent beaucoup plus grande aux agents de destruction. Il ne semble pas que l'on ait affaire ici à des spores ; les points brillants ne sont plutôt que de simples vacuoles (fig. 256 et 258).

Les caractères précédents de forme et de dimensions sont cependant loin d'avoir une constance absolue; on rencontre au contraire de nombreuses variantes en plus ou en moins. Les Bacilles des cultures offrent souvent un type de longueur réduite, une véritable *forme naine*. Les bâtonnets peuvent être très courts, très peu plus longs que larges, ressemblant presque à des coccus. L'examen des crachats tuberculeux en fait parfois rencontrer de semblables.

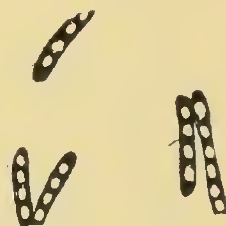


Fig. 258. — Bacilles de la tuberculose. Objectif 1/18, immers. homog., oc. 4, Zeiss (d'après Koch).

L'emploi de certaines méthodes de coloration (Voy. p. 693 et 694) permet de constater la présence de formes très courtes, irrégulières, véritables granulations, les *splitters* (*esquilles*) *de Spengler* (1), les *granules de Much* (2), qui proviendraient d'un processus de dégénérescence des bâtonnets, ayant perdu en partie les propriétés de coloration, mais gardé la virulence et pouvant, par inoculation surtout, donner des lésions renfermant des

(1) Spengler, Ueber Splittersputa Tuberkulöser (*Zeitschr. für Hyg.*, XLIX, 1905, p. 541).

(2) Much, Die nach Ziehl nichtdarstellbaren Formen des Tuberkelbazillus (*Berl. klin. Wochenschr.*, 1908, n° 14).

Bacilles d'aspect ordinaire. De tels Bacilles granuleux seraient très fréquents dans la tuberculose bovine, exceptionnels dans la tuberculose humaine, à tel point que la présence simultanée dans des crachats de Bacilles normaux assez nombreux et de splitters bien nets devrait faire penser à une infection simultanée par les deux races (Spengler).

Ou bien, au contraire, la longueur et aussi la largeur peuvent être beaucoup plus grandes ; ce sont de véritables formes géantes. Metschnikoff (1), puis Nocard et Roux (2), ont les premiers décrit de ces formes rencontrées dans les cultures, formes allongées, ramifiées, souvent renflées en massue (fig. 260). Metschnikoff les considère comme des formes d'involution. Czaplewski (3), Coppen Jones (4) les

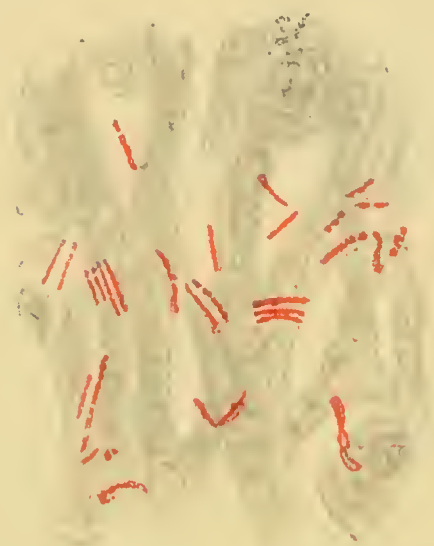


Fig. 259. — *Bacilles tuberculeux* dans des crachats. 1200/1.



Fig. 260. — Bacilles de la tuberculose, formes anormales, ramifiées et renflées (d'après Metschnikoff).

ont retrouvées dans les crachats où Babès (5) les avait déjà signalées en 1886. En s'appuyant sur la présence de ces formes ramifiées et renflées, certains rapprochent le *Bacille de la tuberculose* des *Cladothrix*, de l'*Actinomyces*, et ont même proposé pour lui le nom de *Sclerothrix Kochii*.

Babès et Levaditi (6) ont obtenu des granulations tuberculeuses rappelant de très près l'aspect et la structure des granulations d'*Actinomyces*, en injectant, après trépanation, dans les méninges et le cerveau de lapins, une culture sur gélose glycérinée de tuberculose humaine, peu virulente. La figure 261 est tout à fait convaincante. Les

(1) Metschnikoff, Ueber die phagocytäre Rolle der Tuberkelriesenzellen (*Virchow's Arch.*, CXIII, 1888, p. 63).

(2) Nocard et Roux, Sur la culture du Bacille de la T. (*Ann. de l'Inst. Pasteur*, II. 1888, p. 24).

(3) Czaplewski, Die Untersuchung des Auswurfes auf Tuberkelbacillus. Iéna, 1891.

(4) Coppen Jones, Ueber die Morphologie und systematische Stellung des Tuberkelpilzes und über die Kolbenbildung bei Aktinomycose und Tuberkulose (*Centralbl. für Bakt.*, XVII, 1895, p. 1).

(5) Babès, *in* Cornil et Babès, Les Bactéries. 2e éd., 1886, p. 696.

(6) Babès et Levaditi, Sur la forme actinomycosique du Bacille de la T. (*Arch. de méd. expér.*, IX, 1897, p. 1041).

masses seraient produites par une véritable sécrétion des extrémités terminales des filaments ramifiés, rappelant tout à fait ce qui se rencontre pour l'*Actinomyces*.

Schultze (1) a confirmé ces mêmes résultats et n'hésite pas à rapprocher le *Bacille de la tuberculose* de l'*Actinomyces*.

Jusqu'à plus ample informé, cependant, il paraît préférable de se rallier à l'opinion de Metschnikoff et faire de ces formes de simples déviations involutives du type normal.

La plupart des auteurs décrivent le *Bacille de la tuberculose* comme immobile; Ferran (2) le premier le donne comme mobile. D'après Schumowski (3), les bâtonnets auraient un mouvement vibratoire réel et un mouvement de déplacement lent, mouvements bien visibles dans une culture en goutte pendante ou en écrasant dans une goutte de bouillon une parcelle de culture sur gélose. Les Bacilles des cultures homogènes d'Arloing et P. Courmont (Voy. p. 701) sont doués d'une mobilité très nette, dans toute leur évolution.

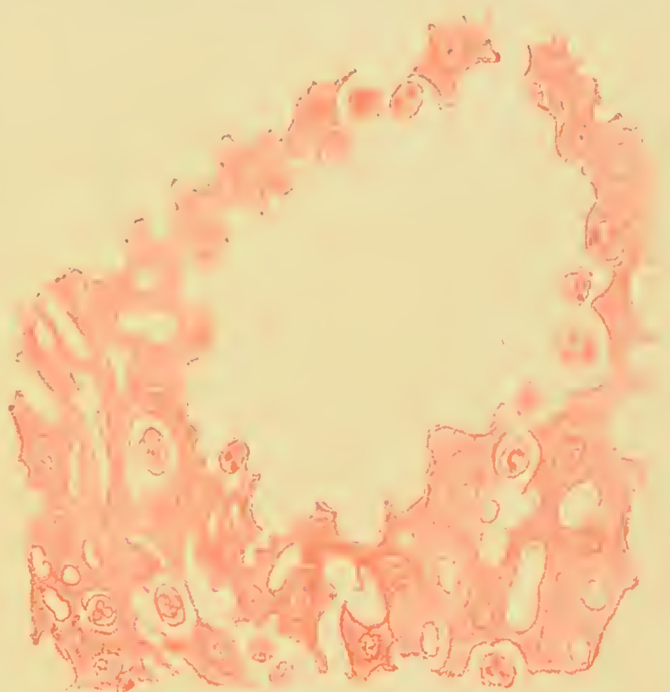


Fig. 261. — Granulation tuberculeuse des méninges du lapin. 1000/1 (d'après Babès).

La présence de cils, affirmée par certains observateurs, est niée par la plupart.

Coloration. — Le *Bacille de la tuberculose* se colore à toutes les couleurs d'aniline. Avec les solutions aqueuses ordinaires, la coloration est très lente; elle est plus rapide en ajoutant un mordant qui peut être un alcali, comme la potasse dans le procédé primitif de Koch, de l'huile d'aniline, de l'acide phénique. Les Bacilles qui se sont alors colorés conservent fortement la couleur; ils résistent pendant quelque temps au moins à l'action décolorante des acides minéraux ou organiques, de l'alcool, ou d'autres bains colorants, sont nettement *acido-résistants* et *alcoolo-résistants*. Traité par le procédé habituel, ce microbe *reste coloré* par la méthode de Gram.

Cette grande résistance aux agents de décoloration est très avantageusement mise à profit pour la recherche des Bacilles tuberculeux dans les produits pathologiques où se trouvent souvent d'autres éléments bacillaires qui ne résistent pas à la décoloration et qu'il devient alors possible de différencier. C'est aussi un caractère très

(1) O. Schultze, Untersuchungen über die Strahlenpilzformen des Tuberkuloseerreger (*Zeitschr. für Hygiene*, XXXI, 1899, p. 153).

(2) Ferran, Aptitudes saprophytes du Bacille de la T.; des affinités avec le Bacille du typhus et le Colibacille; propriétés immunisantes et thérapeutiques de ce Bacille converti en saprophyte (*C. R. de l'Acad. des sc.*, 11 octobre 1897).

(3) Schumowski, Ueber die Beweglichkeit der Tuberkelbacillen (*Centralbl. für Bakt.*, XXIII, 1898, p. 838).

précieux lorsque l'on n'a affaire qu'au *Bacille de la tuberculose* seul.

La résistance à la décoloration a été attribuée à la présence, dans le protoplasma, de matières grasses ou cireuses douées de la propriété de fixer et de retenir les couleurs d'aniline (Voy. p. 690). Les acides gras qui s'y rencontrent sont, en effet, nettement acido-résistants. Mais ce ne sont pas les seuls composants qui jouissent de cette propriété. D'après Auclair et Paris (1), les substances albuminoïdes du microbe, sa trame cellulosique seraient également acido-résistantes. Les graisses neutres présentes, par contre, ne le sont pas. Les Bacilles très jeunes résistent souvent mal à la décoloration.

La résistance à la décoloration n'est, du reste, que relative. Une plus longue action du réactif décolorant amène une décoloration graduelle. Les acides minéraux décolorent rapidement lorsqu'ils sont chauffés vers 100°. D'un autre côté, les Bacilles résistent d'autant mieux qu'ils ont subi l'action de colorants plus forts et que la coloration s'est faite à chaud.

La question de temps intervient donc largement ici. Il importe beaucoup de la fixer. Elle paraît varier dans des limites assez larges. Philibert (2) a observé que certains *Bacilles tuberculeux* pouvaient résister à la décoloration par l'acide nitrique au tiers pendant quarante minutes, d'autres seulement pendant sept minutes et même moins, mais toujours tous les *Bacilles tuberculeux* ont résisté très bien à une *décoloration de deux minutes*, qu'on peut admettre comme durée optimum. Pour l'alcool absolu, la résistance peut être largement fixée à *une heure*. Ces données sont précieuses pour le diagnostic.

A vrai dire, cette résistance à la décoloration par certains agents décolorants, les acides particulièrement, cette *acido-résistance*, comme on dit, n'est pas spéciale au *Bacille de la tuberculose*. D'autres espèces microbiennes la présentent aussi, à des degrés divers. Koch avait déjà cité le *Bacille de la lèpre* comme se comportant de la même façon sur ce point. Le même fait a été reconnu peu après pour le *Bacille du smegma*. C'est ensuite d'assez nombreuses espèces dites *pseudo-tuberculeuses* ou *paratuberculeuses* dont certaines peuvent l'avoir à un degré égal à celui de la première espèce ; puis d'autres qui la possèdent à un degré moindre.

On peut, à ce point de vue, classer ces espèces en *acido-résistants forts*, *Bacille de la tuberculose*, *Bacilles pseudo-tuberculeux* ou *paratuberculeux vrais* ou *Bacilles tuberculoïdes*, *Bacille de la lèpre* ; et *acido-résistants faibles*, comme le *Bacille du smegma*, les Bacilles résistants de l'urine, de la sécrétion sébacée de la peau, du cérumen, des crachats. Il est des particularités qui permettent de faire la distinction ; elles seront exposées et discutées plus loin (*Les Bacilles pseudo-tuberculeux*, p. 775). Elles sont des plus importantes à connaître, pour les espèces de la seconde catégorie surtout ; en clinique, en effet, il n'arrive pas d'avoir à distinguer le *Bacille de la tuberculose* des *Bacilles pseudo-tuberculeux* vrais; souvent, au contraire, il faut pou-

(1) Auclair et Paris, Constitution chimique du Bacille de Koch et de sa substance unissante ; ses rapports avec l'acido-résistance (*Arch. de méd. expér.*, 1902). Auclair, Les modifications du Bacille tuberculeux humain (*Arch. de méd. expér.*, 1903, XV, p. 469).

(2) Philibert, Les pseudo-bacilles acido-résistants. Thèses de Paris, 1908.

voir le distinguer des Bacilles acido-résistants faibles, dits aussi *pseudo-Bacilles acido-résistants* comme il sera dit plus loin.

Nicolle (1) donne en outre comme résistant à la décoloration le *Streptothrix du farcin du bœuf*, pour lequel j'ai obtenu des résultats opposés, et le *Bacille de la verruga du Pérou*, décrit par Izquierdo (2), qui voisine peut-être avec le *Bacille de la lèpre*. D'autres formes classées parmi les *Streptothrix* paraissent aussi être souvent acido-résistantes (3).

D'autres éléments que des microbes peuvent également présenter cette résistance à la décoloration par les acides ; les spores l'ont en général, diverses granulations cellulaires aussi, par exemple la chromatine des noyaux en karyokinèse.

D'un autre côté, certaines races du *Bacille de la tuberculose* résistent mal à la décoloration, ou peuvent même perdre tout à fait leur acido-résistance. Ce sont surtout les Bacilles accoutumés à vivre en *cultures homogènes* dans des bouillons, la race obtenue par Ferran, par exemple, et, plus irrégulièrement toutefois, celle d'Arloing et P. Courmont (Voy. p. 769).

Les méthodes employées pour colorer d'une façon spéciale le *Bacille de Koch* sont très nombreuses ; il n'y aurait aucun avantage à les citer toutes. Elles ne sont du reste que des modifications du *procédé d'Ehrlich* qui a perfectionné la méthode primitive de Koch exposée au commencement de cet article. Nous n'en citerons que quelques-unes, les principales :

Procédé d'Ehrlich. — Ehrlich se sert comme mordant d'*eau anilinée*, préparée comme il a été indiqué page 376 ; il faut toujours l'employer fraîche. Le bain colorant s'obtient en ajoutant un dixième environ de solution alcoolique saturée de la couleur d'aniline, fuchsine, bleu, violet, suivant la teinte que l'on veut obtenir. Le bain s'emploie chaud ; vers 60°, la coloration est plus rapide. On laisse les préparations dans le bain jusqu'à ce qu'elles soient *fortement* colorées ; un quart d'heure suffit amplement ; une surcoloration n'est pas à craindre.

La décoloration se fait avec l'*acide nitrique au tiers* (p. 384) ; il faut se souvenir que la résistance à la décoloration du Bacille a des limites et ne pas dépasser deux minutes d'action ; la décoloration est toujours complète après ce temps. Il est souvent très avantageux de faire une *double coloration* à l'aide d'un bain colorant d'une nuance qui tranche bien sur la première ; on se rend mieux compte de la nature des éléments autres qui peuvent se rencontrer dans la préparation (Voy. p. 386).

Ce procédé d'Ehrlich donne des résultats excellents. Coloré de cette manière, le *Bacille de la tuberculose* semble particulièrement acido-résistant. L'ennui d'avoir à préparer chaque fois une eau anilinée fraîche fait préférer d'autres méthodes, la suivante surtout, extrêmement commode dans la pratique courante.

Procédé de Ziehl ou de Ziehl-Neelsen. — C'est le procédé de choix

(1) Nicolle, Pratique des colorations microbiennes (*Ann. de l'Inst. Pasteur*, IX, 1895, p. 664).

(2) Izquierdo, *Virchow's Arch.*, XCIX, 1885.

(3) Fortineau et Soubrane, Sur un Streptothrix rouge pathogène acido-résistant (*Bull. de l'Inst. Pasteur de la Loire-Inférieure*, 1904-1905, p. 53). — Voy. aussi Flexner, *Loc. cit.*, p. 792.

pour la pratique ordinaire, en raison des bons résultats qu'il donne et de la commodité de son exécution. Le mordant employé est l'acide phénique. On se sert de la *solution de Ziehl* (p. 377) modifiée par Neelsen, qui contient 1 gramme de fuchsine au lieu de 0gr,25. Il est à recommander de la préparer en suivant minutieusement les indications données. Ce liquide a le grand avantage de se conserver longtemps. On y met les préparations ou on en verse quelques gouttes sur la lame préparée et l'on chauffe jusqu'à production de vapeurs, pendant un quart d'heure environ. La décoloration se fait pendant deux minutes à l'acide nitrique au tiers ou de préférence à l'acide sulfurique dilué au quart (acide sulfurique, 25; eau, 100). Rondelli et Buscalioni (1) emploient comme décolorant l'eau de Javel étendue de dix fois son poids d'eau.

Philibert (2) recommande de faire suivre l'action décolorante de l'acide nitrique au tiers par celle de l'alcool, ce qui permet d'éliminer d'une façon sûre beaucoup des Bacilles acido-résistants qu'une méthode plus simple pourrait laisser colorés et faire prendre pour du Bacille de Koch. Il préconise la technique suivante :

Solution de Ziehl à chaud	10 minutes.
Acide nitrique au tiers	2 —
Laver à l'eau, puis :	
Alcool absolu (ou alcool à 95°)	3 —
Bleu de Unna pour coloration de fond	5 —
Alcool jusqu'à décoloration du bleu.	

Procédé de Gabbet. — C'est une modification du procédé de Ziehl, peut-être moins sûre que lui.

Gabbet (3) colore à la solution de Ziehl, comme il a été dit, puis fait à la fois la décoloration et une recoloration de fond, en traitant par de l'acide sulfurique au quart dans lequel a été dissous 2 p. 100 de bleu de méthylène.

Les *Bacilles de la tuberculose* sont colorés en rouge ; le fond est bleu ou un peu rosé, selon que la décoloration a été plus ou moins poussée.

Procédé de B. Fraenkel (4). — Les préparations sont colorées à chaud par la méthode d'Ehrlich, eau anilinée et fuchsine ou violet; après lavage, elles sont soumises, pendant une à deux minutes, à l'action du mélange suivant :

Alcool à 90°	50 centimètres cubes.
Eau distillée	30 — —
Acide azotique	20 — —
Bleu de méthylène	à saturation.

Le décolorant est uni au colorant de fond ; le mélange se conserve indéfiniment.

Procédé de Kühne (5). — L'agent de différenciation est le chlorhy-

(1) Rondelli et Buscalioni, Ueber eine neue Färbungsmethode des Tuberkelbacillus (*Centralbl. für Bakt.*, XXI, 1897, p. 70).
(2) Philibert, Les pseudo-bacilles acido-résistants. Thèse de Paris, 1908.
(3) Gabbet, Rapid stammy of the tubercle Bacillus (*The Lancet*, 9 avril 1887).
(4) B. Fraenkel, *Berlin. klin. Wochenschr.*, 1884, n° 13.
(5) Borrel, T. pulmonaire expérimentale (*Ann. de l'Inst. Pasteur*, VII, 1889, p. 593).

drate d'aniline qui a l'avantage de nuire beaucoup moins que les acides aux éléments cellulaires qui peuvent se rencontrer dans les préparations. C'est, sans contredit, le meilleur décolorant à employer ; il a toutefois l'inconvénient d'être assez coûteux et ennuyeux à préparer, parce qu'il faut toujours employer des solutions fraîches.

Les préparations sont colorées dans la *solution de Ziehl* pendant dix minutes à un quart d'heure, placées pendant quelques secondes dans une solution de chlorhydrate d'aniline à 2 p. 100, ou même 4 et 5 p. 100, puis décolorées par l'alcool. La coloration de fond se fait à volonté.

Procédé de Hauser (1). — L'action décolorante des acides minéraux peut être trop énergique : en prolongeant un peu trop l'action du bain acide, le *Bacille tuberculeux* peut être décoloré. Les acides organiques ont des effets moins violents ; Petri préconise dans ce but l'acide acétique glacial ; Watson Cheyne, l'acide formique ; Cornil, Alvarez et Tavel, l'acide oxalique. Hauser préfère les acides tartrique, citrique et surtout lactique, à 5 à 10 p. 100 en solution aqueuse ou à 2 ou 3 p. 100 en solution alcoolique. La préparation colorée au Ziehl à chaud, comme il a été indiqué ci-dessus, est soumise pendant quelques minutes au bain décolorant aqueux ; ce contact peut même être prolongé pendant une demi-heure sans que, pour la majorité des Bacilles, la teinte baisse sensiblement : avec les solutions alcooliques, quelques secondes suffisent.

Procédé de Spengler. — L'acide picrique avait été signalé par Kühne comme donnant de très bons résultats ; on obtient avec lui une coloration de fond jaune qui facilite les recherches.

Spengler (2) recommande la manière de faire suivante. La préparation est colorée à chaud avec la solution de Ziehl, puis traitée pendant quelques secondes à l'*alcool picrique :*

Solution aqueuse saturée d'acide picrique.....................	60
Alcool absolu..	40

Elle est lavée à trois reprises dans de l'alcool à 60°, décolorée par de l'acide nitrique à 15 p. 100, passée à l'alcool à 60° jusqu'à ce qu'il ne reste plus trace de couleur, et enfin lavée à nouveau à l'alcool picrique.

Les Bacilles sont colorés en rouge foncé ; le fond est jaune. Spengler croit que l'on peut, par cette méthode, distinguer de gros Bacilles longs et granuleux qui seraient des Bacilles bovins et de fins Bacilles uniformément granuleux qui seraient des Bacilles humains.

Procédé de Herman. — Herman (3) utilise comme mordant le carbonate d'ammoniaque à 1 p. 100 dans l'eau distillée et comme colorant la solution de cristalviolet à 3 p. 100 dans l'alcool à 95°. Ces solutions sont mises en flacons séparés et bien bouchés.

Pour l'usage, on ajoute une partie de colorant à trois parties de mordant et on mélange parfaitement. Les frottis ou les coupes sont traités pendant une minute par le bain chauffé vers 100°, puis décolorés pendant quatre ou cinq secondes par l'acide nitrique à 10 p. 100, lavés

(1) Hauser, Note sur la coloration du Bacille de la T. (*Soc. de Biol.*, 29 oct. 1897).

(2) Spengler, Neue Färbe Methoden für Perlsucht und Tuberkelbacillen (*Deutsche med. Wochenschr.*, 1907, n° 9).

(3) Herman, Sur la coloration du Bacille tuberculeux (*Ann. de l'Inst. Pasteur*, XXII, 1908, p. 92).

à l'alcool à 95° et séchés ou portés trente secondes dans une solution alcoolique d'éosine à 1 p. 100 pour colorer le fond. Les Bacilles tuberculeux sont colorés en violet. D'après Herman, cette méthode donnerait des résultats positifs alors que les autres auraient échoué, même avec des Bacilles déjà altérés et en voie de dégénérescence en granules.

Procédé de Much. — D'après Much (1), sa méthode, comme du reste celle qui précède, peut aisément faire reconnaître, dans des préparations, la présence de *Bacilles tuberculeux* en plus grand nombre qu'avec la méthode de Ziehl, et surtout de Bacilles en voie de dégénérescence, transformés en granulations (*granulations de Much*), là où les procédés habituels, ceux d'Ehrlich ou de Ziehl par exemple, ne donnent que des résultats négatifs. Le fait que de telles granulations ont conservé une grande virulence. peuvent reproduire des lésions où se trouve le Bacille normal, explique l'importance de l'observation. Much emploie une sorte de méthode de Gram renforcée, combinée avec le procédé d'Ehrlich.

Il colore les coupes ou les frottis par un séjour de vingt-quatre à quarante-huit heures dans un bain d'eau anilinée colorée au violet de gentiane (p. 376). Il traite pendant cinq minutes par la solution de Gram, décolore ensuite par l'alcool-acétone (p. 380) et, si la décoloration n'est pas suffisante par l'acide nitrique à 5 p. 100 pendant dix secondes. Les Bacilles sont colorés en violet; les granulations provenant d'un début de dégénérescence des Bacilles ont la même nuance et se distinguent facilement, avec un peu d'habitude, des précipités granuleux que donne souvent la méthode de Gram.

Nous reviendrons encore sur les méthodes de coloration à propos de la recherche du *Bacille tuberculeux* dans les produits pathologiques et du diagnostic de la tuberculose.

Cultures. — Le *Bacille de la tuberculose* se cultive facilement sur divers milieux. Il est exclusivement aérobie et ne croît pas en l'absence d'oxygène. Il exige pour se développer une température relativement élevée; la multiplication commence à 28° ou 29°, est très faible à 30° et se fait au mieux vers 38°; à 41°, on n'observe plus aucune croissance, même après un long temps, avec les Bacilles humain et bovin. Même dans les meilleures conditions, les cultures demandent de huit à quinze jours pour apparaître. Le *Bacille aviaire* se développe encore bien à 43° et sensiblement même jusqu'à 45°. Le *Bacille pisciaire* se développe bien à 20°.

Koch est parvenu le premier à cultiver cette espèce sur le sérum sanguin. Il est difficile d'obtenir des cultures pures avec les crachats tuberculeux, à cause du grand nombre de Bactéries qu'ils contiennent, dont le développement plus rapide étouffe rapidement la végétation lente du *Bacille de la tuberculose*. Il vaut mieux s'adresser à de la matière tuberculeuse, recueillie directement à l'autopsie et au mieux sur un cobaye inoculé sous la peau du ventre, qu'on sacrifie quinze jours ou trois semaines après l'inoculation. La prise de substance se fait dans le foie ou la rate, surtout s'ils sont riches en tubercules, en usant de toutes les précautions voulues pour s'opposer à l'introduction de germes étrangers. Enfin, Koch recommande. comme condition essentielle, de bien broyer cette matière tuberculeuse avant de l'ensemencer. On le fait facilement en la triturant dans un tube stérilisé, avec une forte baguette

(1) MUCH. Die nach Ziehl nicht darstellbaren Formen des Tuberkelbacillus (*Berl. klin. Wochenschr.*, 1908. n° 14).

de verre. Il faut ensemencer largement sur sérum coagulé, au mieux glycériné à 4 p. 100, en frottant fortement la surface, la grattant même légèrement. L'ensemencement doit porter sur un assez grand nombre de tubes, beaucoup pouvant rester stériles.

D'après Kitasato (1), il est possible d'obtenir des cultures directement avec les crachats en procédant de la façon suivante : On fait cracher le malade le matin, dans un verre ou récipient stérilisé. On prend, à l'aide d'un fil de platine stérilisé, des grumeaux jaunâtres qu'ils contiennent et on les lave au moins une dizaine de fois dans de l'eau stérilisée, en les agitant, pour les débarrasser le plus possible des microbes étrangers. On les dilacère ensuite dans un peu d'eau stérilisée et l'on étend de petites parcelles à la surface de sérum ou de gélose glycérinée. On peut ainsi observer le développement de colonies de *Bacille de la tuberculose*. Pastor (2) mêle intimement de petites quantités de crachats avec de la gélatine liquéfiée, coule en plaques et ensemence, après quelques jours, des parcelles de gélatine où aucune colonie ne s'est développée. D'après Hesse (3), on réussirait très bien en faisant les cultures sur de la gélose glycérinée additionnée de 5 p. 100 d'*albumine soluble de Heyden*. La présence de mucus faciliterait la prolifération.

Spengler (4) a imaginé un procédé assez ingénieux, mettant à profit la résistance assez grande du *Bacille de la tuberculose* à l'action des vapeurs de formol qui détruisent beaucoup plus vite les Bactéries se trouvant ordinairement avec lui. Il place, dans une boîte de Petri, un morceau de papier buvard plié en double et couvre la boîte avec une feuille de papier-filtre épais bien débordante pour permettre de placer le couvercle avec frottement, puis stérilise à la chaleur sèche. Sur le papier du fond, il étale un gros crachat. Il verse 10 à 12 gouttes de formol sur le papier qui adhère au couvercle, ferme et place pendant vingt minutes à l'étuve. Quelques grosses parcelles de crachats sont alors prélevées et largement ensemencées sur sérum coagulé, préalablement glycériné à 6 p. 100. Le procédé réussit quelquefois, mais échoue souvent ; l'action du formol est trop forte, tout est stérilisé, ou bien d'autres microbes résistent qui prennent vite le dessus.

On parvient plus facilement à obtenir des cultures pures de *Bacille de la tuberculose* en portant des crachats, des morceaux d'organes non stériles, même en putréfaction, ou d'autres produits qui contiennent ce microbe à côté d'autres espèces, en faisant usage d'*antiformine*, solution d'hypochlorite de soude additionnée de soude caustique, ainsi que l'ont montré Uhlenhuth et Kersten (5). Cette antiformine, dont il sera parlé plus complètement plus loin (*Recherche du Bacille de la tuberculose dans les crachats*, p. 751), dissout facilement et complètement la plupart des

(1) Kitasato, Gewinnung von Reinkulturen der Tuberkelbacillen und anderer pathogener Bakterien aus Sputum (*Zeitschr. für Hygiene*, XI, 1892).

(2) Pastor, Eine Methode zur Gewinnung von Reinkulturen der Tuberkelbacillen aus dem Sputum (*Centralbl. für Bakt.*, XI, 1892, p. 233).

(3) Hesse, Ein neues Verfahren zur Züchtung des Tuberkelbacillus (*Zeitschr. für Hygiene*, XXXI, 1899, p. 502).

(4) Spengler, Zur Formaldehyd-Abtötung und Züchtung der Tuberkel und anderer saürefester Bacillen (*Zeitschr. für Hygiene*, LI, 1905, p. 335).

(5) Uhlenhuth et Kersten, Eine neue Methode zum kulturellen und mikroskopischen Nachweis von Tuberkelbazillen im Sputum und anderen tuberkulösen Material (*Zeitschr. für experim. Pathol.*, VI, 1909, n° 3).

Bactéries; le *Bacille de la tuberculose* résiste, par contre, longtemps à son action, protégé par les matières grasses qui l'imprègnent ; bien des spores aussi, les spores charbonneuses par exemple, pour une raison analogue. Avec les crachats, par exemple, on peut opérer de la façon suivante : 20 à 30 centimètres cubes environ de crachats tuberculeux sont traités par 15 centimètres cubes d'antiformine auxquels on a ajouté assez d'eau pour que le tout fasse 100 centimètres cubes. Le contact est prolongé de deux à cinq heures, en agitant de temps en temps, jusqu'à ce que le mélange devienne limpide. On centrifuge dans un tube stérilisé et on ensemence largement du dépôt obtenu sur sérum coagulé ou sur

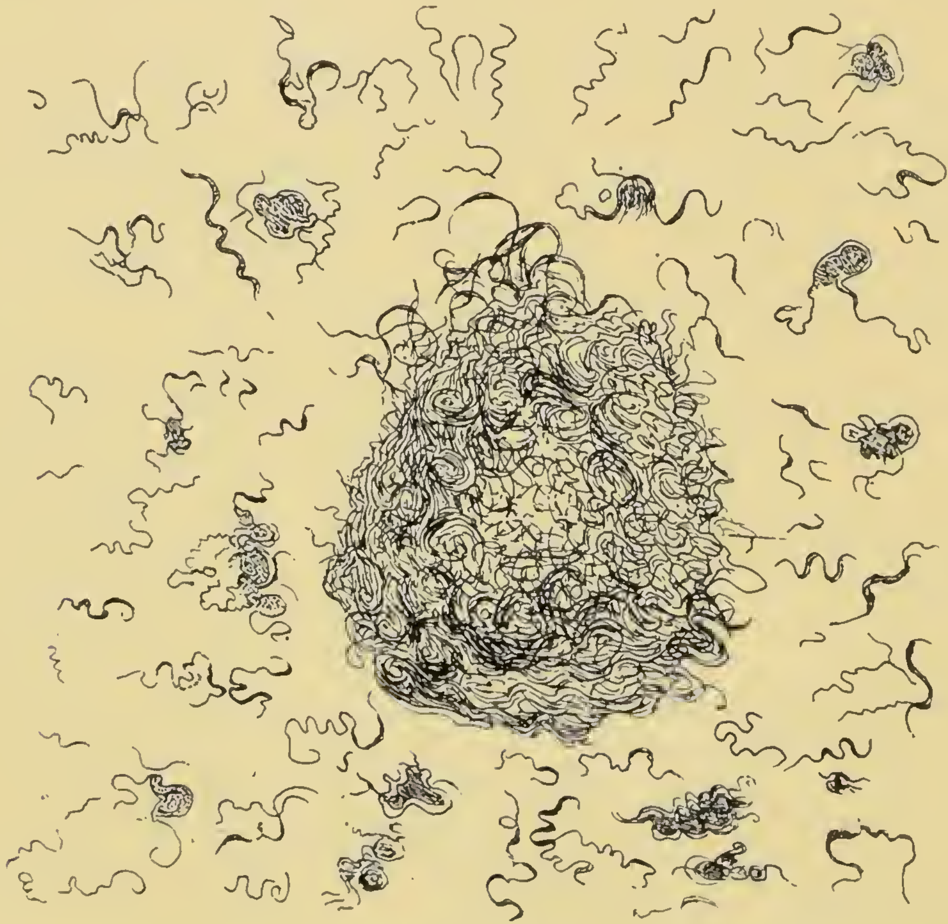


Fig. 262. — Aspect de la surface d'une culture de *Bacille de la tuberculose* sur sérum solidifié. 80/1 (d'après Koch).

gélose au sang. Les colonies du *Bacille de la tuberculose* se développent dans le temps voulu.

Cultures sur sérum. — En inoculant en *strie* sur du *sérum solidifié*, il apparaît à la surface, au bout de dix à quinze jours, de petites taches d'un blanc mat, sans éclat, qui se distinguent par là du substratum environnant. Ces taches ressemblent à de petites lames écailleuses sèches, lâchement accolées à la surface de la gelée. Il s'en forme parfois suffisamment pour couvrir la partie libre du milieu. Ces petites colonies sont surtout très nombreuses lorsque l'ensemencement a été fait avec du contenu de caverne riche en Bactéries. Elles peuvent même confluer entre elles et former une sorte de membrane. Ces masses possèdent une certaine consistance ; agitées dans du liquide, elles ne se dissocient pas, mais tombent au fond en bloc. De telles cultures se développent bien dans des petits godets de verre plats, recouverts d'un couvercle fermant bien. On dispose dans ces vases une couche de 1 à 2 centimètres

de sérum et on le stérilise et le solidifie comme s'il s'agissait de tubes.

Les colonies sur sérum solidifié, vues à un grossissement de 80 diamètres, présentent un aspect assez particulier et très caractéristique. Elles paraissent composées de petits amas linéaires, sinueux, élégamment courbés, dont les plus petits ont la forme d'un S; les plus longs décrivent en serpentant de nombreux tours (fig. 262). La partie médiane de ces sortes d'arabesques est plus épaisse; les extrémités sont appointies. Dans les parties épaisses de la culture, ces Zooglées linéaires sont tassées en grand nombre, enchevêtrées les unes dans les autres. Ces lignes sinueuses bizarres sont constituées par des Bacilles disposés en un ordre régulier et constant. Il est facile de s'en convaincre en faisant une de ces préparations microscopiques que nous avons désignées sous



Fig. 263. — Préparation par impression de *Bacille tuberculeux*. 700/1 (d'après Koch).

le nom de *préparation par impression* (p. 392). Une lamelle très propre est appliquée à la surface d'une culture et maintenue peu de temps légèrement appuyée; elle est retirée rapidement et verticalement avec des pinces fines, de façon à ne pas frotter la colonie. De cette manière, les Bactéries superficielles s'accolent à la lamelle en gardant leurs rapports respectifs. Cette lamelle est fixée et colorée par les procédés ordinaires. On obtient alors l'aspect représenté figure 263. Chacune des lignes sinueuses de la colonie se montre formée de Bacilles accolés dans leur longueur et dirigés suivant le grand axe de la Zooglée: le nombre des bâtonnets accolés est plus ou moins grand en un endroit donné, selon la largeur de la colonie en ce même endroit. Koch pense qu'il existe une sorte de gelée fondamentale qui retient les différents articles dans un ordre si régulier. Mais ce n'est pas seulement dans les cultures qu'on est à même d'observer cette disposition toute spéciale; elle se montre dans l'organisme aussi nette, dans tous les cas où le développement des Bacilles n'est pas gêné. Elle semble être le résultat d'un ordre de développement particulier. La figure 263 représente l'aspect d'une préparation par impression d'un gros amas tuberculeux du foie d'un cobaye, en tout semblable à celui obtenu avec les cultures sur sérum.

D'après Ledoux-Lebard (1), l'élément qui va donner une colonie se

(1) Ledoux-Lebard, Structure des colonies du Bacille tuberculeux (*Arch. de méd. expér.*, mai 1898).

développerait par ramification en Y ou en X ; les fragments se séparent assez vite, mais restent accolés en faisceaux par une substance unissante provenant de l'enveloppe externe.

Koch a réussi à cultiver cette même espèce sur le *sérum liquide* stérilisé; il s'y développe à la surface une mince membrane blanchâtre, sèche, très fragile, qui se brise à la moindre agitation et se dépose au fond du vase; le liquide reste indéfiniment limpide.



Fig. 264. — Culture du *Bacille de la tuberculose* sur gélose glycérinée, en strie.

Le sérum solidifié est encore aujourd'hui un des meilleurs milieux qui permettent d'isoler assez facilement le *Bacille de la tuberculose* directement des produits tuberculeux du cobaye. D'après Straus et Gamaléia (1), il est préférable d'employer du sérum peptonisé et sucré. A partir de la quatrième ou cinquième génération sur ce milieu, les cultures deviennent plus faciles et plus abondantes; il s'est produit une sorte d'acclimatement aux milieux artificiels; on peut alors obtenir des cultures sur d'autres milieux, où l'espèce n'aurait rien donné si on l'y avait ensemencée d'emblée.

Le Bacille bovin se développe comme le Bacille humain sur le sérum solidifié. Le Bacille aviaire y donne une culture plus abondante, plus grasse et plus humide.

Cultures sur milieux glycérinés. — Nocard et Roux (2) ont facilité de beaucoup l'obtention des cultures du Bacille de la tuberculose en conseillant d'ajouter à différents milieux des proportions assez fortes de glycérine, 5 à 8 p. 100. La végétation y est beaucoup plus abondante que sur les milieux ordinaires, lorsqu'on les ensemence avec un Bacille qui s'est déjà acclimaté sur sérum. La plupart du temps, même, le *Bacille humain*, au lieu de donner des cultures ternes, sèches, mates, qu'il forme sur sérum et autres milieux ordinaires, donne des cultures abondantes, plissées, molles, que l'on considérait comme spéciales au *Bacille aviaire*.

La *gélose glycérinée* (p. 248) est le milieu qui paraît le mieux convenir. En *strie*, la surface du tube se couvre d'une nappe blanchâtre, épaisse, molle et plissée au centre, plus mince et un peu sèche aux bords (fig. 264). La culture n'est bien développée qu'après quinze jours ou trois semaines; elle prend avec l'âge une teinte ocracée, parfois même rosée. En *piqûre*, le développement ne se fait pas dans la profondeur de la piqûre, mais seulement à la surface; il se forme une culture épaisse, saillante, mamelonnée, à bords sinueux, d'abord blanche, puis jaunâtre (fig. 264 et 265). Il est à recommander de mettre le plus possible la

(1) Straus et Gamaléia, Recherches expérimentales sur la T. (*Arch. de méd. expér.*, III, 1891, p. 457).

(2) Nocard et Roux, Sur la culture du Bacille de la T. (*Ann. de l'Inst. Pasteur*, I, 1887, p. 19).

matière d'inoculation en contact avec la gelée, en traçant un sillon avec l'aiguille et la dissociant dans ce sillon; les cultures se développent plus vite et sont plus abondantes. Ces cultures, toutes celles sur milieux glycérinés d'ailleurs, dégagent une odeur très agréable, rappelant celle de pomme rainette.

Le *Bacille de la tuberculose aviaire* pousse avec les mêmes caractères, un peu plus abondamment encore, sur la gélose glycérinée; sa culture y est plus épaisse et plus molle; ce n'est là qu'une différence de degré.



Fig. 265. — Culture en piqûre sur gélose du *Bacillus tuberculosis.* Gr. nat. (d'après Nocard et Roux).

Besançon et Griffon (1) recommandent la *gélose glycérinée au sang* qu'on obtient en ajoutant, à la gélose glycérinée fondue dans les tubes, une petite quantité de sang aseptique, au sortir du vaisseau de l'animal. On fait le mélange en évitant de secouer le tube. La culture serait plus facile à obtenir et plus abondante. Elle a une légère coloration brunâtre, due à la diffusion d'hémoglobine.

D'après Hesse (2), on obtiendrait d'excellents résultats en se servant de gélose glycérinée additionnée de 5 p. 1 000 du produit connu sous le nom d'*albumine soluble de Heyden*, préparée d'après la formule suivante :

Albumine soluble de Heyden	5	grammes.
Sel	5	—
Glycérine	30	—
Agar-agar	10	—
Eau distillée	1000	—

Alcaliniser avec 5 centimètres cubes de solution normale de soude.

On coule en boîtes de Petri que l'on ensemence par stries. A l'aide de préparations par impression, on peut constater le développement du Bacille tuberculeux, après cinq ou six heures de séjour à l'étuve. On obtient même de bons résultats avec les crachats tuberculeux.

Sur *sérum glycériné* à 4 ou 5 p. 100, la culture est plus précoce; elle peut apparaître dès le quatrième jour. En quinze ou vingt jours, elle forme une masse blanche, épaisse, plissée ou mamelonnée.

Sur *pomme de terre*, les *Bacilles tuberculeux*, provenant de cultures acclimatées sur gélose glycérinée, végètent très bien. Pawlowsky (3) a obtenu le premier de telles cultures. Il recommande d'ensemencer la surface en la frottant avec une spatule de platine, pour faire pénétrer la matière d'inoculation dans la substance du substratum. En plaçant les tubes à l'étuve vers 38°, on aperçoit vers le douzième jour, sur la surface ensemencée, de petites taches grisâtres, ternes, sèches, qui sont des colonies de *Bacille de la tuberculose*. Vers le vingtième jour, toute la surface ensemencée est recouverte d'un enduit blanchâtre, sec, qui se

(1) Besançon et Griffon, Culture du Bacille tuberculeux sur le sang emprisonné dans la gélose glycérinée (*Soc. de Biol.*, 4 février 1899).

(2) Hesse, Ein neues Verfahren zur Züchtung des Tuberkelbacillus (*Zeitschr. für Hygiene*, XXXI, 1899, p. 502).

(3) Pawlowsky, Culture des Bacilles de la T. sur la pomme de terre (*Ann. de l'Inst. Pasteur*, II, 1888, p. 303).

laisse facilement enlever par raclage; la culture s'épaissit encore avec l'âge.

On peut obtenir des cultures faciles et abondantes en se servant, d'après le conseil de Nocard, de *pommes de terre glycérinées* (p. 251). Il est bon de mettre au fond des tubes une petite quantité du liquide glycériné. Les cultures commencent à être bien visibles une dizaine de jours après l'ensemencement. Au bout de vingt à trente jours, la culture est souvent épaisse, plissée, molle, un peu jaunâtre. Elle a souvent gagné le liquide qui est au fond du vase et s'étale alors à sa surface en formant un voile sec, blanc, qui grimpe la plupart du temps aux parois.

Les cultures des Bacilles humains et bovins sur pommes de terre glycérinées ne peuvent en rien différer de celles du Bacille aviaire type.

Sur *bouillon glycériné*, il est facile d'obtenir des cultures; c'est un milieu particulièrement précieux pour l'étude des produits solubles formés par le Bacille. La culture s'y fait le plus ordinairement en voile, beaucoup plus rarement en un sédiment floconneux, léger. Le liquide reste toujours clair. Il est à recommander d'ensemencer ces cultures avec des parcelles qu'on laisse flotter à la surface du liquide. La matière d'ensemencement la plus favorable est un morceau de ce voile fragile qui se produit, dans les cultures sur pomme de terre, sur le liquide du fond du tube; avec les débris d'un tel voile, la réussite est beaucoup plus certaine. Au bout d'une dizaine de jours, on aperçoit aux bords de la parcelle ensemencée une auréole blanchâtre, cireuse, presque transparente. L'auréole s'étend assez vite et finit par former un mince voile sec et fragile qui recouvre toute la surface du bouillon. Le voile s'épaissit, se plisse, devient mou, ou, au contraire, reste sec, scarieux, se brise facilement; ce voile grimpe souvent sur une hauteur d'un centimètre aux parois du vase.

D'après H. Martin (1), les bouillons fabriqués avec la chair de divers poissons, tout particulièrement avec le hareng, forment un très bon milieu de culture. La chair du poisson, dilacérée dans un appareil à hacher, est additionnée d'une fois et demie son poids d'eau et portée à l'ébullition pendant trois quarts d'heure. On filtre bouillant jusqu'à ce que le liquide soit limpide. Le bouillon est souvent neutre; dans le cas contraire, il faut l'alcaliniser légèrement. On ajoute 6 p. 100 de glycérine. On peut s'en servir pour préparer la gélose ou la gélatine.

D'après Carnot (2), l'addition d'une petite quantité de tuberculine aux milieux de culture hâte beaucoup le développement initial du microbe. Le passage de l'animal aux milieux artificiels est également facilité. Une forte quantité de ce produit est au contraire défavorable.

Les cultures obtenues sur ces différents milieux donnent des colonies compactes. Sur les milieux liquides, en particulier, ce sont des voiles d'aspect variable, qui comprennent et réunissent tous les éléments provenant de la végétation; aucun ne reste en suspension dans le liquide. Pour pouvoir étudier sur ce microbe le phénomène de l'agglutination, Arloing (3) a cherché à obtenir des cultures formant une émulsion

(1) H. Martin, Sur la culture du Bacille de la T. (*Arch. de méd. expér.*, Paris, I, 1889, p. 77).

(2) Carnot, Effets de l'addition de tuberculine aux cultures de Bacilles de Koch (*Soc. de Biol.*, 16 juillet 1898).

(3) Arloing, Obtention de cultures et d'émulsions homogènes du Bacille de la T.

homogène de microbes dans le liquide employé. Il y est parvenu en partant de cultures sur pomme de terre, fortement imprégnées d'un excès d'eau glycérinée. De telles cultures, ensemencées dans des tubes de bouillon que l'on agite soigneusement au moins une fois par jour, donnent de véritables *cultures homogènes*, où il ne se forme pas de voile, mais où le liquide se trouble d'une façon uniforme et montre au microscope des bâtonnets réellement mobiles, isolés ou réunis en petit nombre, présentant les réactions colorantes habituelles.

D'après Dorset (1), l'*œuf* serait un bon milieu de culture. Le *Bacille tuberculeux* ne pousserait pas sur le blanc seul, et très peu sur le jaune seul. On mélange intimement le blanc et le jaune; on répartit le produit dans des tubes que l'on chauffe à 70° deux jours de suite, chaque fois pendant quatre heures. On verse, dans chaque tube, deux gouttes d'eau stérilisée, puis on ensemence en surface avec de la matière tuberculeuse bien broyée et l'on porte à l'étuve après avoir bouché les tubes à la paraffine.

Besançon et Griffon recommandent la *gélose à l'œuf* obtenue en mélangeant un peu de jaune d'œuf cru à de la gélose fondue, maintenue au-dessous de 50°.

Cultures dans le lait. — Le Bacille de la tuberculose ne se cultive pas dans le *lait*, même à sa température optima; il y reste cependant virulent pendant plusieurs mois (2).

Cultures en milieux chimiquement définis. — Pour certaines recherches, on peut avoir intérêt à employer des milieux artificiels, chimiquement définis. On peut se servir du liquide de Fraenkel et Voges (p. 227), auquel il y a avantage à ajouter 5 à 6 p. 100 de glycérine; des liquides de Proskauer et Beck (p. 228), surtout du n° 3; du liquide d'Ouchinsky (p. 227). Froin (3) a obtenu de belles cultures dans la solution suivante :

Liquide de Froin.

Chlorure de sodium	6,0
Chlorure de potassium	0,5
Phosphate bisodique	0,5
Sulfate de magnésie	0,3
Chlorure de calcium	0,15
Glycérine	40,0
Glucosamine	2,0
Sarcosamine	2,0
Eau	1000,0

Baudran (4) recommande le liquide suivant, qui a été établi en tenant

humaine en milieu liquide et variété mobile de ce Bacille (*C. R. de l'Acad. des sc.*, 9 mai 1898).

(1) Dorset, The use of eggs as a medium for the cultivation of Bacillus tuberculosis (*Amer. med.*, III, 1902, p. 555).

(2) Sabrazès, Vitalité du Bacille de Koch incorporé au lait de vache (*Acad. de méd.*, 26 avril 1898).

(3) Froin, Culture du Bacille tuberculeux sur la glucosamine et la sarcosamine (*Soc. de Biol.*, 28 mai 1910).

(4) Baudran, Bacilles de Koch. Milieux aux glycérophosphates. Doses maxima de fer et de manganèse (*C. R. de l'Acad. des sc.*, mai 1910, CL, p. 1200).

compte de la composition des cendres du *Bacille tuberculeux* et de la quantité de phosphates qu'il enlève aux milieux de culture.

Liquide de Baudran.

Glycérophosphate de soude		2,24
—	de potasse	0,60
—	de chaux	1,20
—	de magnésie	1,76
Albumoses Byla		10,00
Glycérine		50,00
Citrate de soude		4,00
Eau		1000,00

A stériliser à 100°.

Les Bacilles des cultures sont souvent plus courts que ceux que l'on trouve d'ordinaire dans les crachats et les produits tuberculeux de l'homme et des animaux; certains même sont à peine plus longs que larges. Ils présentent les mêmes particularités et principalement se comportent comme eux à l'égard des méthodes de coloration.

PROPRIÉTÉS BIOLOGIQUES

Ce qui domine tout, dans la biologie du *Bacille de la tuberculose*, ce sont ses propriétés virulentes, son action sur les organismes vivants réceptifs. Bien que cette virulence ne soit pas constante, qu'elle puisse varier suivant les origines, s'atténuer, voire même disparaître, il n'en est pas moins vrai que c'est elle qui constitue le caractère primordial, véritablement spécifique.

Ce microbe apparaît comme une espèce pathogène vraie, un parasite obligé; son rôle saprophytique, qui semble cependant bien exister, et représenterait peut-être l'état primitif, ne peut être considéré que comme un fait exceptionnel.

La virulence est donc le caractère dominant; les autres propriétés vitales ne peuvent pas s'en séparer. C'est elle qui constitue la base de la spécification; on ne retrouve ou reconnaît pas ce microbe par ses cultures ou ses caractères morphologiques divers, mais par l'inoculation, que l'on ait affaire à des cultures ou à des produits pathologiques.

Vitalité et virulence. — Toutes les cultures sont virulentes au début; Koch a obtenu par leur inoculation des résultats identiques à ceux que donnent les produits tuberculeux; Nocard et Roux, et à leur suite de très nombreux expérimentateurs, ont constaté les mêmes faits. L'inoculation sous-cutanée à un cobaye sain d'une parcelle de produit de culture pure de *Bacille de la tuberculose* se fait facilement en pratiquant à la peau de l'abdomen une petite boutonnière qu'on agrandit avec une sonde mousse stérilisée. La plaie paraît se guérir vite; mais, du dixième au quatorzième jour, il s'y forme une petite induration qui s'ulcère tout en n'ayant pas de tendance à grandir. L'animal meurt nettement tuberculeux au bout de trois semaines ou un mois d'ordinaire. L'inoculation sous la peau, dans la cavité abdominale, dans la chambre antérieure de l'œil de cobayes ou de lapins, détermine, en peu de temps, une tuberculose typique, avec généralisation dans les principaux organes.

La virulence ne semble s'atténuer par aucun des moyens employés à cet effet. L'atténuation ne se fait pas mieux par passages successifs dans l'organisme animal; on peut établir des séries très nombreuses d'inoculations provenant l'une de l'autre, sans voir diminuer en rien l'intensité de la maladie.

Les diverses cultures, et principalement les cultures sur gélose glycérinée, perdent cependant de leur virulence avec le temps ; elles peuvent à la longue devenir inoffensives ou ne produire qu'une simple lésion locale analogue à celle qu'on verra plus loin (p. 711) pouvoir être déterminée par les Bacilles morts.

Bataillon et Terre (1) disent avoir obtenu une véritable race saprophytique de *Bacille tuberculeux* en faisant passer du Bacille virulent, de tuberculose humaine ou aviaire, par l'organisme d'animaux à sang froid, poissons ou grenouilles.

Cette persistance de la virulence se retrouve du reste à un haut degré dans les produits tuberculeux pris dans l'organisme, provenant d'une tuberculose spontanée. On a voulu la faire dépendre de la présence, encore problématique, de spores dans la Bactérie spécifique. Les crachats tuberculeux, en particulier, peuvent rester actifs des mois entiers, jusqu'à dix mois d'après Sormani (2), mais un aussi long délai paraît un peu exceptionnel, s'ils sont desséchés d'une façon lente et graduelle. D'après Galtier (3), des produits tuberculeux parfaitement desséchés à une température de 30° environ peuvent infecter des cobayes tout aussi rapidement que des produits frais. Des morceaux de tissus tuberculeux laissés à macérer et putréfier dans l'eau à la température ordinaire, pendant un laps de temps variant de cinq à vingt jours, d'autres soumis à des congélations de — 5° ou — 8°, suivies de dégels successifs, ont pu produire une véritable tuberculose, parfaitement transmissible en séries. Moeller (4) et Musehold (5) ont constaté que les Bacilles tuberculeux résistaient pendant des mois dans l'eau d'égout. Ces conclusions contredisent absolument l'opinion émise par Baumgarten (6), qui prétend que la putréfaction atténue le virus tuberculeux, dont l'activité s'affaiblit au bout de quelques jours, puis disparaît complètement. Le développement d'autres espèces peut cependant entraver celui du *Bacille tuberculeux*, qui cède le pas à certaines dont l'action se substitue à la sienne ou plutôt la devance. En inoculant à des lapins de la matière tuberculeuse putréfiée, G. Daremberg (7) a produit une septicémie et aucun accident tuberculeux (Voy. p. 565). C'est cette remarque qui a conduit différents expérimentateurs à essayer d'arrêter le développement du

(1) Bataillon et Terre, La forme saprophytique de la T. humaine et de la T. aviaire (*C. R. de l'Acad. des sc.*, 1897, p. 1399).

(2) Sormani, *Giornale del Soc. ital. d'Igiene*, VIII, 1884.

(3) Galtier, Danger des matières tuberculeuses qui ont subi le chauffage, la dessiccation, le contact de l'eau, la salaison, la congélation et la putréfaction (*C. R. de l'Acad. des sc.*, 1887).

(4) Moeller, Zum Sputumbeseitigung (*Zeitschr. für Tuberkulose*, 1901, II, p. 147).

(5) Musehold, Ueber die Widerstangfähigkeit der Tuberkelbazillen in Abwässern, im Fluswasser und cultivirten Boden (*Arb. aus dem Kaiserl. Gesundheitsamte*, 1900, XVII, p. 56).

(6) Baumgarten, Ueber die Uebertragbarkeit der T. durch die Nahrung und über Abschwaechung der pathogene Wirkung der Tuberkulosebacillen durch Fäulniss (*Centralbl. für klin. Med.*, 1884, n° 22).

(7) G. Daremberg, Note sur une septicémie du lapin (*Soc. de Biol.*, 1886, p. 457).

Bacille tuberculeux en provoquant au lieu attaqué, le poumon surtout, la pullulation d'espèces saprophytes, tout à fait inoffensives pour l'organisme. Les résultats de cette méthode de *Bactériothérapie* sont loin d'être concluants.

La virulence des produits tuberculeux ou des cultures que l'on a obtenues d'eux est cependant loin d'être toujours identique. Elle peut varier dans des limites assez larges, et s'apprécie alors d'après les effets observés à la suite d'inoculation aux animaux, au cobaye ou au lapin principalement (1). D'après Auclair (2), toutefois, les affaiblissements qui peuvent s'observer avec la tuberculose humaine de provenance diverse ne seraient que momentanés; il serait toujours possible de revenir à une virulence ordinaire en faisant passer le virus par un cobaye et en faisant des cultures avec ses organes.

Galtier (3) et Maffucci (4) ont étudié l'influence de la *dessiccation*. Elle paraît assez peu marquée et en tout cas ne se fait sentir qu'après plusieurs mois; dans les crachats, la survie peut être très longue, des mois, peut-être une année et plus.

Le *Bacille de la tuberculose* est assez sensible à l'action de la *chaleur*. Le fait a une très haute importance dans la pratique. D'après les recherches de Yersin (5), Grancher et Ledoux-Lebard (6), faites sur des cultures en bouillon glycériné, la virulence du Bacille diminue lorsqu'il a été chauffé à 60° pendant cinq minutes ; une température de 70° pendant le même laps de temps détruit toute virulence et toute vitalité. En desséchant au préalable des cultures à une douce chaleur, elles résistent beaucoup plus; elles conservent leur virulence de deux à sept heures à 70° ; soumises à une chaleur sèche de 100° pendant une, deux et trois heures, leur virulence s'affaiblit graduellement, mais sans disparaître entièrement.

Forster (7) a observé que dans la vapeur d'eau la mort survenait à 60° entre quarante-cinq et soixante minutes, à 70° de cinq à dix minutes; dans le lait, lait tuberculeux ou lait infecté artificiellement, comme dans beaucoup de liquides d'ailleurs, le microbe est réellement tué dans les limites de temps suivantes : à 55° après quatre heures, à 60° en une heure, à 65° en quinze minutes, à 70° en dix minutes, à 80° en cinq minutes, à 90° en deux minutes, à 95° en une minute, à 100° instantanément. Une température de 50°, maintenue pendant douze heures, n'a montré aucun effet. D'autres évaluations ont été données précédemment (p. 99); les différences des conditions de milieu expliquent la divergence des résultats énoncés.

(1) Vagedes, Experimentelle Prüfung der Virulenz der Tuberkelbacillen (*Zeitschr. für Hygiene*, XXVIII, 1898, p. 276). — Kimla, Poupé et Vesely, Contribution à la biologie et la morphologie du Bacille de la T. (*Congrès de Moscou*, 1898, et *Revue de la T.*, 1898, p. 25).

(2) Auclair, Virulence des Bacilles tuberculeux humains de sources diverses (*Arch. de méd. expér.*, 1897, p. 1124).

(3) Galtier, *Loc. cit.*, p. 703.

(4) Maffucci, Die Hühnertuberculose (*Zeitschr. für Hygiene*, II, 1892, p. 461).

(5) Yersin, De l'action de quelques antiseptiques et de la chaleur sur le Bacille de la T. (*Ann. de l'Inst. Pasteur*, II, 1888, p. 60).

(6) Grancher et Ledoux-Lebard, Action de la chaleur sur la fertilité et la virulence du Bacille tuberculeux (*Arch. de méd. expér.*, 1892, p. 1).

(7) Forster, Ueber die Abtötung der Tuberkelbacillen durch Erhitzung (*Centralbl. für Bakt.*, 1 Abth., Orig., LI, 1909, p. 417).

On s'explique, d'après ces données, les résultats obtenus par Toussaint, Galtier, sur les viandes tuberculeuses cuites ; les viandes simplement saignantes peuvent garder leur virulence, alors que les viandes bouillies l'ont totalement perdue.

Il y a cependant des réserves à faire sur de telles données, qui ne peuvent pas être considérées comme générales. Certaines conditions du milieu, la réaction en particulier, influent notablement, comme il a déjà été dit (p. 98 et suiv.), sur la résistance à la chaleur de beaucoup de germes microbiens, le *Bacille de la tuberculose* entre autres. Dans les milieux alcalins, le lait, par exemple, la résistance est plus grande d'une façon générale, comme l'ont montré depuis longtemps Pasteur, puis Duclaux (1). A ce point de vue, il faut reconnaître que les résultats annoncés par divers expérimentateurs sont loin d'être concordants. Pour Beck (2), du lait tuberculeux chauffé pendant trente minutes à 80° peut encore rendre tuberculeux des cobayes ; Lydia Rabinowitch dit qu'un chauffage de trente minutes à 87° ne suffit pas à détruire le Bacille tuberculeux dans la crème ; Bartel et Stenström (3) ont constaté qu'un chauffage à 80° pendant dix minutes était insuffisant pour détruire la virulence, pour le cobaye, d'un lait provenant d'une vache atteinte de tuberculose avancée de la mamelle. Van der Sluis (4) croit que, pour détruire la virulence des laits tuberculeux, il est nécessaire de leur faire subir un chauffage à 80° pendant une heure.

D'un autre côté, Morgenroth (5) a vu le chauffage à 70° pendant trente minutes détruire la virulence du lait; Lévy et Bruns (6), ayant inoculé un fort lot de cobayes avec du lait additionné de *Bacille tuberculeux* très virulent, puis porté à 65° et maintenu pendant quinze à vingt-cinq minutes à cette température, au bain-marie, n'ont vu aucun des cobayes devenir tuberculeux. Il résulte de ceci qu'on ne peut guère compter d'une façon absolue, au point de vue de la tuberculose, sur une *pasteurisation* hâtive du lait ; il faudrait qu'elle puisse se faire en chauffant pendant une demi-heure à la température de 65° à 70° ; et encore, si un lait peu alcalin donne de bons résultats, on peut ne pas les obtenir avec un autre plus alcalin ; le chauffage à 80°, pendant une demi-heure au moins, donnerait plus de sécurité.

Il est des conditions spéciales où la résistance à la chaleur paraît plus grande. Pour les crachats, par exemple, il faudrait cinq minutes d'ébullition pour détruire toute virulence. Le fait est dû probablement à la formation, par coagulation, d'une coque albumineuse qui protège quelque peu contre la chaleur. Le même fait peut s'observer avec d'autres liquides riches en albumine, pus, sang, sérosités, etc.

(1) Duclaux, Traité de microbiologie, I, p. 282.

(2) Beck, Experimentelle Beiträge zur Untersuchung über die Marktmilch (*Deutsche Vierteljahrsschr. für öff. Gesundheitspflege*, 1900, p. 430).

(3) Bartel et Stenström, Beitrage zur Frage der Einflusses hoher Temperaturen auf Tuberkelbacillen in der Milch (*Centralbl. für Bakt.*, XXX, 1901, p. 429).

(4) Van der Sluis, Ueber die Abtötung der Tuberkelbacillen in natürlich infizierter Milch und über die Pasteurisierung der Milch (*Centralbl. für Bakt.*, 1 Abth., Orig., L, 1909, p. 378).

(5) Morgenroth, Versuche über Abtötung von Tuberkelbacillen in Milch (*Hygienische Rundschau*, 1900, p. 865).

(6) Lévy et Bruns, Ueber die Zerstörung der Tuberkelbacillen in der Milch durch Einwirkung von Temperaturen unter 100° (*Hygienische Rundschau*, 1901).

Koch avait déjà annoncé que l'action directe de la *lumière solaire* pouvait rapidement tuer le *Bacille de la tuberculose*. Migneco (1), en expérimentant sur des produits tuberculeux, a confirmé et étendu ces résultats. Il a observé que l'insolation ne modifie pas la virulence du Bacille quand elle ne se prolonge pas au-dessus de deux heures ; au bout de trois heures d'insolation, la virulence est atténuée, et cette atténuation augmente avec la durée de l'exposition aux rayons du soleil. La disparition de la virulence n'a pas été observée, même après un long temps d'insolation (quarante-cinq heures). Jousset (2), expérimentant sur des crachats, a trouvé que la virulence s'atténuait très nettement déjà après une heure d'insolation et arrivait à disparaître complètement après sept heures ou plus. La lumière diffuse serait seulement un peu moins active. Pour obtenir une stérilisation complète, il faudrait, d'après lui, une exposition de quarante-huit heures à la lumière solaire ou à la lumière diffuse.

Le *suc gastrique* a peu d'action sur la vitalité et la virulence du *Bacille tuberculeux*. Les recherches de Straus et Wurtz, de Sabrazès (3), démontrent qu'il ne perd ces propriétés qu'après un contact de trente-six heures. Rappin (4) dit que l'*urée* entrave nettement les cultures à 0gr,10, 0gr,30 et 0gr,50 p. 100, et les empêche complètement à 1 gramme p. 100 ; le carbonate d'ammoniaque à 0gr,20 p. 100 arrête entièrement le développement.

Action des antiseptiques. — Yersin a étudié l'action des antiseptiques sur les Bacilles des cultures, mais seulement en éprouvant leur vitalité par ensemencement sur milieu favorable, méthode inférieure certainement à l'inoculation au cobaye ; la question mériterait certainement d'être reprise de cette dernière façon. Le tableau suivant résume les résultats qu'il a obtenus :

ANTISEPTIQUES.	TITRE des SOLUTIONS.	DURÉE DE CONTACT par laquelle tous les germes ne sont pas tués.	DURÉE DE CONTACT suffisante pour tuer tous les germes.
Acide phénique	50 pour 1000	»	30 secondes.
—	10 —	»	1 minute.
Alcool absolu	»	»	5 minutes.
Éther iodoformé	10 pour 1000	»	5 —
Éther	»	5 minutes.	10 —
Bichlorure de mercure	1 pour 1000	5 —	10 —
Thymol	3 —	2 heures.	2 heures.
Eau saturée de créosote	»	1 heure.	»
Eau saturée de naphtol	»	1 —	»
Acide salicylique	25 pour 1000	1 —	6 heures.
Acide borique	40 —	12 heures.	»

(1) Migneco, Azione della luce solare sulla virulenza del bacillo tuberculare (*Ann. d'Igiene sperim.*, V, 1895, p. 215).

(2) Jousset, Action de la lumière solaire et de la lumière diffuse sur le Bacille de Koch contenu dans les crachats tuberculeux (*Soc. de Biol.*, 27 octobre 1900). — Action de la lumière solaire et de la lumière diffuse sur les crachats tuberculeux (*Ibid.*, 15 mars 1902).

(3) Sabrazès, Action du suc gastrique sur les propriétés morphologiques et sur la virulence du Bacille de Koch (*Soc. de Biol.*, 11 juin 1898).

(4) Rappin, Action de l'urée sur les cultures en bouillon du Bacille de la tuberculose (*Bull. de l'Inst. Pasteur de la Loire-Inférieure*, 1901-1902).

En somme, la résistance aux antiseptiques paraît assez faible.

Cependant, il y a des exceptions. Ce microbe paraît plus résister que beaucoup d'autres à l'action de l'aldéhyde formique (p. 88) ; pour le tuer dans les crachats, il faudrait un contact d'une heure avec la solution à 5 p. 100. Il résiste aussi pas mal à l'iode; pour le tuer, il faut un contact de vingt-quatre heures environ avec la solution à 1 p. 500. Le permanganate de potasse à 4 ou 5 p. 100 paraît n'avoir aucune action.

Composition chimique et produits formés. — Les Bacilles sont constitués par une enveloppe, la membrane, et un contenu cellulaire.

D'après Hammerschlag (1), l'enveloppe serait constituée par de la cellulose; pour Nishimura (2), le composé serait de l'hémicellulose ; pour Auclair et Paris (3), elle renfermerait beaucoup de cellulose résistant à la potasse à l'ébullition et se colorant en bleu par l'iode après action de l'acide sulfurique. Ruppel (4) dit qu'il s'y rencontre en plus une substance albuminoïde se colorant en rose par le réactif de Millon, peut-être de la chitine ou de la kératine.

Le *Bacille tuberculeux* des cultures, d'après Hammerschlag, renfermerait en moyenne 85,9 p. 100 d'eau et 14,1 p. 100 de substance sèche.

Kressling (5) donne la composition suivante pour la masse bacillaire desséchée :

	Pour 100.
Humidité (dessiccation à 100°-110°)	3,9375
Cendres	2,55
Azote	8,575
Substances albuminoïdes	53,59
— grasses	38,95
— non azotées (dosées par différence)	0,9725

On trouve donc des sels minéraux, des substances albuminoïdes, des matières grasses et des hydrates de carbone.

Schweinitz et Dorset (6) donnent pour les cendres la composition suivante :

	Pour 100.
Soude	12,62
Potasse	6,35
Chaux	12,64
Magnésie	11,55
Acide carbonique et silice	0,57
Acide phosphorique	55,23

Il faut remarquer la forte proportion d'acide phosphorique que le microbe prend au milieu, organisme vivant ou milieu artificiel, et l'absence d'autres radicaux acides, à part une faible quantité d'acide carbonique; puis la teneur élevée en chaux et en magnésie.

(1) Hammerschlag, Bakteriologische Chemische Untersuchungen über Tuberkelbacillen (*Centralbl. für klin. Med.*, 1891, p. 1).

(2) Nishimura, Ueber den Cellulosegehalt tuberkulöser Organe (*Arch. für Hyg.*, 1894, XXI).

(3) Auclair et Paris, *Loc. cit.*, p. 690.

(4) Ruppel, Zur Chemie der Tuberkelbacillen (*Zeitschr. für physiol. Chemie*, XXVI, 1899, p. 218).

(5) Kressling, Ueber die Fettsubstanz der Tuberkelbacillen (*Berlin. klin. Wochenschr.*, XXX, 1901, p. 896).

(6) Schweinitz et Dorset, The mineral constituents of the tubercle bacilli (*Centralbl. für Bakt.*, XXIII, 1898, p. 993).

On est peu fixé sur la nature des matières albuminoïdes présentes. Weyl (1), en traitant des cultures sur gélose glycérinée par une lessive de soude faible, à chaud, a obtenu un liquide laissant séparer par refroidissement des flocons blancs, qui ne se dissolvent que dans l'acide sulfurique concentré.

Cette substance se colore bien aux couleurs d'aniline et résisterait à la décoloration par les acides. La couche gélatineuse qui surmonte le dépôt floconneux, traitée par l'acide acétique, donne un précipité brunâtre qui, redissous dans une lessive de soude à 2 p. 1000 et injecté sous la peau de cobayes, provoque un processus de nécrose au point d'inoculation.

Weyl pense que cette substance est une *toxomucine*, tout en disant qu'elle pourrait être une nucléo-albumine. Pour d'autres, la plus grande partie des substances azotées serait une nucléine qui, d'après de Giaxa (2) et Gioffreddi (3), aurait une action locale irritative manifeste et occasionnerait facilement la mort chez le lapin ou le chien par suite de son action coagulante sur le sang. Ruppel pense que la majeure partie de la substance protéique est de la tuberculose-amine qui est unie à un acide nucléinique très toxique pour le cobaye, qui serait, pour Behring (4), le véritable principe actif de la tuberculine.

Parmi les substances azotées présentes doivent aussi se ranger des produits solubles toxiques et des ferments diastasiques, qui ne se trouvent qu'en proportions extrêmement minimes. Il en sera question plus loin.

Les matières grasses se rencontrent en fortes proportions, de 25 à 39 p. 100 de substance sèche généralement, suivant le cas ; ces variations peuvent dépendre de la constitution du milieu, les échantillons du microbe et l'âge des cultures. Ces substances sont des graisses neutres, des acides gras libres, principalement acides palmitique, arachidique et laurique d'après Bulloch et Mac Leod (5), un peu de lécithine, 0,16 p. 100 d'après Kressling, peut-être d'autres graisses phosphorées. D'après Aronson (6), la matière grasse serait une véritable cire.

Les hydrates de carbone sont représentés par le composé cellulosique de la membrane et un peu de pentose, d'après Bendix (7).

Le *Bacille de la tuberculose* ne produit jamais d'indol dans les milieux peptonisés.

On pourrait constater la présence d'un peu d'alcool et d'une substance aromatique d'odeur agréable, odeur de fleur ou de fruit.

Il ne se forme jamais d'hydrogène sulfuré.

(1) Th. Weyl, Zur Chemie und Toxicologie des Tuberkelbacillus (*Deutsche med. Wochenschr.*, 1891, p. 256).

(2) De Giaxa, Sulla sostanza ad azione locale del bacillo della tubercolosi (*Ann. d'Igiene sperim.*, X, 1900, p. 191).

(3) Gioffreddi, Ueber die biologische Wirkund des tuberculären Nucleins von de Giaxa (*Riforma medica*, 1900).

(4) Behring, Ueber die specifische giftigen Eigenschaften der Tuberkülinesaïre (*Berl. klin. Wochenschr.*, 1899, n° 25, p. 537).

(5) Bulloch et Mac Leod, The chemical constitution of the tubercule bacillus (*Journ. of Hygiene*, IV, 1904, p. 1).

(6) Aronson, Zur Biologie der Tuberkelbacillen (*Berlin. klin. Wochenschr.*, 1898, n° 22).

(7) Bendix, Zur Chemie der Bakterien (*Deutsche med. Wochenschr.*, 1901, n° 2, p. 18).

Carrière (1) signale dans les cultures l'existence d'un ferment soluble agissant sur les graisses, décomposant la monobutyrine en acide butyrique, analogue ou identique à la lipase. D'après Fermi (2), il se produirait un peu de ferment saccharifiant. Il n'y a jamais d'action protéolytique.

PRODUITS TOXIQUES. — Parmi les produits que forme le *Bacille de la tuberculose*, les plus intéressants sont, sans contredit, les produits toxiques. Les recherches faites sur ce point sont très nombreuses et, il faut le reconnaître, encore insuffisamment précisées.

R. Koch a le premier précisé l'existence de produits solubles toxiques dans les bouillons de culture ; c'est l'origine de sa découverte de la tuberculine dont il sera parlé plus loin.

De nombreuses recherches, en particulier celles d'Auclair (3), démontrent la grande complexité de ces produits toxiques pouvant être englobés sous la dénomination de *toxine tuberculeuse*. Certaines de ces substances restent unies aux corps microbiens : ce sont de véritables *endotoxines*; d'autres diffusent dans le milieu.

Les poisons de la première catégorie semblent plutôt des poisons à action locale. Ce sont de véritables poisons *nécrosants*. Ils paraissent avoir des rapports intimes avec les matières grasses dont il a été parlé plus haut. Ces dernières peuvent, toutefois, n'être que des substrats imprégnés des véritables produits actifs, n'existant alors que dans des proportions extrêmement minimes.

D'après Auclair, l'éther, le xylol, la benzine, le chloroforme extraient des corps bactériens tués à 115° une matière grasse jaunâtre, onctueuse, brûlant avec crépitation dans la flamme, complètement insoluble dans l'eau et se colorant fortement par la méthode d'Ehrlich. Le chauffage à 115° ne modifie en rien les qualités de ces extraits; il en augmente plutôt la proportion. Cette substance grasse est nettement toxique.

Elle paraît être formée de plusieurs produits différents. Suivant le dissolvant employé, on peut obtenir un extrait montrant des différences notables dans son action physiologique.

L'extrait éthéré, *éthérobacilline* d'Auclair, est un poison caséifiant, produisant, en injection sous-cutanée chez le cobaye, des abcès caséeux typiques, ou en injection intraveineuse ou dans le parenchyme d'organes vasculaires, le foie, le rein par exemple, des follicules tuberculeux typiques évoluant en tubercules caséeux. Lorsque la dose est un peu forte, l'animal, au bout de six semaines, maigrit, se cachectise et meurt.

Le chloroforme donne un extrait, *chloroformobacilline* d'Auclair, qui, dans les mêmes conditions, produit des lésions fibreuses ou fibrocaséeuses, des tubercules fibreux.

L'ammoniaque extrait une matière solide, peu ou pas odorante,

(1) CARRIÈRE. Sur l'existence d'un ferment soluble dans les cultures de Bacille de Koch (*Soc. de Biol.*, 16 mars 1901).

(2) FERMI. *Centralbl. für. Bakt.*, 1re Abth., orig., XL, 1906, p. 187.

(3) AUCLAIR, Étude expérimentale sur les poisons du Bacille tuberculeux humain. Essais de vaccination et de traitement. Thèse de Paris, 1897, et *Arch. de méd. expér.*, 1898. — ID., Les poisons du Bacille tuberculeux humain ; la dégénérescence caséeuse (*Revue de la T.*, VI, 1898, p. 97). — ID., Les poisons du Bacille tuberculeux humain ; recherches sur la pneumonie tuberculeuse (*Arch. de méd. expér.*, 1899).

soluble dans l'eau, ne présentant pas l'aspect gras des produits précédents. Cette substance, inoculée au cobaye, n'a aucune action locale, mais détermine, à doses suffisantes, une cachexie assez rapidement mortelle.

L'alcool extrait à froid environ 8 p. 100 du poids de la masse bacillaire. Le liquide prend vite une coloration rouge, due à l'oxydation d'une substance chromogène qui s'y trouve. L'extrait, de consistance molle, est formé en grande partie d'acides gras.

Les corps bactériens privés de ces substances grasses par les réactifs sont plus minces que les Bacilles normaux et se présentent souvent sous la forme de chaînettes de coccus.

D'après Vallée (1), les Bacilles dégraissés introduits chez les veaux par voie digestive ou intraveineuse conféreraient l'immunité à l'égard d'inoculations virulentes.

Les corps microbiens dégraissés sont toxiques ; Martin et Vaudremer (2), Cantacuzène (3), ont montré qu'ils produisaient chez le cobaye une intoxication aiguë ou chronique suivant les doses introduites. En inoculation intrapéritonéale, à doses suffisantes ils produisent rapidement la mort avec hypothermie ; à doses moindres, ils déterminent de l'hypothermie, puis formation de nodules tuberculeux qui peuvent se résorber.

Il existerait des produits toxiques volatils. La distillation des bouillons de culture donne des produits d'autant plus toxiques qu'elle est faite à plus haute température. Ces produits distillés élèvent la température chez le cobaye sain et plus chez le cobaye tuberculeux ; ils ont un pouvoir irritant local très marqué et vont jusqu'à produire une ulcération au point d'inoculation ; leur action curative ou préventive est nulle.

De l'extrait éthéré se dégage un corps volatil dont l'inhalation détermine des symptômes généraux se rapprochant par plusieurs points de ceux observés à la suite de l'inoculation de la tuberculine de Koch : il faut prendre de sérieuses précautions pendant la manipulation.

Les poisons de la deuxième catégorie, poisons diffusibles, semblent être de nature tout à fait différente, se rapprocher plus des autres toxines microbiennes, substances albuminoïdes peut-être, moins connues en tout cas que les précédentes parce que plus difficiles à isoler. Ils se retrouvent dans les milieux de culture, surtout milieux liquides ; aussi, pour leur étude, se sert-on de bouillons de culture filtrés, principalement pour ceux connus sous le nom de *tuberculines*, les tuberculines de Koch en particulier, dont il sera parlé plus loin.

Leur nature est encore bien peu connue.

D'après Maragliano (4), les filtrats tuberculeux contiennent une toxalbumine détruite à 55°-60°, sécrétée par le microbe qui l'abandonne au milieu nutritif, différant surtout de la tuberculine en ce qu'elle cause de l'hypothermie chez le cobaye tuberculeux, et une toxoprotéine, résistant à 100°, fixée surtout dans les corps bacillaires.

(1) Vallée, Bacilles tuberculeux dégraissés (*Soc. de Biol.*, 6 juin 1906).

(2) Martin et Vaudremer, Bacilles tuberculeux dégraissés (*Soc. de Biol.*, 1906, n° 28).

(3) Cantacuzène, Recherches sur la maladie expérimentale provoquée par l'inoculation de Bacilles tuberculeux dégraissés (*Ann. de l'Inst. Pasteur*, XIX, 1905, p. 699).

(4) Maragliano, Der wässrige Auszug der Tuberkelbacillus und seine Derivate (*Berlin. klin. Wochenschr.*, 1899, n° 18, p. 385).

Besançon et Gougel (1) obtiennent aussi une toxalbumine similaire beaucoup plus toxique que la tuberculine pour le cobaye sain ou tuberculeux.

La *Bacillocaséine* d'Auclair et Paris(2), obtenue par précipitation des filtrats par l'acide acétique, est probablement voisine ou identique. Pour Fontes (3), cette bacillocaséine constituerait les granulations restant colorées par la méthode de Gram qui se remarquent dans les Bacilles.

Ces diverses substances toxiques, encore trop peu connues, avec leurs effets différents, rendent compte de la plupart des phénomènes provoqués par le *Bacille tuberculeux*, formation de tubercules et de pus caséeux, amaigrissement, fièvre, cachexie et mort. La tuberculose apparaît nettement comme une intoxication par les produits sécrétés par le *Bacille tuberculeux*. Aucune de ces substances n'a montré nettement d'effet curatif ou préventif.

Les *Bacilles tuberculeux* morts contiennent encore des substances actives. Koch avait constaté que des cultures tuées par la chaleur, par l'ébullition dans l'eau, par l'action d'antiseptiques sûrs, provoquaient de la suppuration locale quand on les inoculait à doses assez fortes sous la peau de cobayes sains. Il avait remarqué, en même temps, que chez des cobayes manifestement tuberculeux l'inoculation sous-cutanée de doses faibles de ces mêmes cultures amenait la mort de six à quarante-huit heures; avec des doses excessivement minimes, la mort ne survient pas, il ne se produit qu'une lésion locale et l'état général semble s'améliorer. C'est cette dernière observation qui l'a conduit à préparer sa tuberculine et à l'appliquer au traitement de la tuberculose. Maffucci (4) avait aussi constaté cette action toxique des cultures stérilisées ou mortes, et avait remarqué que leur inoculation ne produisait pas seulement des effets nécrotiques locaux, mais encore des phénomènes généraux de cachexie qui amenaient la mort de l'animal à une échéance plus ou moins éloignée suivant la dose de culture employée. Les expériences de Prudden et Hodenpyl (5), Straus et Gamaléia (6) prouvent avec toute évidence que les *Bacilles tuberculeux* morts conservent une grande partie des propriétés pathogènes caractéristiques des microbes vivants. En injection sous-cutanée, ils déterminent de la suppuration, avec ou sans phénomènes de cachexie, de véritables abcès froids; en injection intraveineuse ou intrapéritonéale, ils provoquent, comme les Bacilles vivants, la formation de véritables tubercules dans les organes où ils sont transportés. L'examen microscopique de ces lésions, pus ou

(1) Besançon et Gouget, Action comparée des poisons tuberculeux (*Soc. de Biol.*, 1899, p. 521).

(2) Auclair et Paris, Contribution chimique et propriétés biologiques du protoplasma du Bacille de Koch (*C. R. de l'Acad. des sc.*, CXLVI, 1908, p. 301).

(3) Fontes, Estudos sobre a tuberculose (*Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*. Rio de Janeiro, II, 1910, p. 186).

(4) Maffucci, Ueber die Wirkung der reinen, sterilen Kulturen des Tuberkelbacillus (*Centralbl. für allg. Path.*, 1890, p. 825).

(5) Prudden et Hodenpyl, Studies on the action of dead bacteria in the living body (*New York med. Journ.*, 1891).

(6) Straus et Gamaléia, Contributions à l'étude du poison tuberculeux (*Arch. de méd. expér.*, III, 1891, p. 705).

tubercule, y démontre la présence de Bacilles spéciaux, colorables, mais morts. La seule différence avec les Bacilles vivants est que les Bacilles morts, ne se multipliant pas, ne déterminent de lésions qu'aux endroits où ils ont été déposés ou transportés par la circulation ; les lésions ne se généralisent pas ; les Bacilles morts sont pathogènes, mais pas infectieux. La résorption et la disparition des Bacilles se font lentement, plus rapidement avec des Bacilles jeunes (1).

TUBERCULINES

Les substances actives diffusibles sont contenues, partiellement au moins, dans les produits désignés sous le nom de *tuberculines*.

Tuberculines de Koch. — Les plus intéressantes sont certainement les tuberculines étudiées par Koch et principalement sa première tuberculine, sa *tuberculine ancienne*. C'est d'elle qu'il va d'abord être question.

On se souvient encore du retentissement considérable qu'a eu au Congrès de Berlin, en 1890, la communication de Koch sur l'action de la tuberculine sur le cobaye, provoquant une réaction importante sur l'animal tuberculeux et pouvant même y amener un arrêt de la tuberculose avancée, une guérison de la tuberculose au début. Les premiers résultats de l'application de cette *lymphe de Koch* au traitement de la tuberculose de l'homme (2) ont véritablement remué le monde. Il a fallu malheureusement en rabattre à ce point de vue curatif, aussi bien pour l'homme que pour l'animal. Malgré cela, des faits importants restent acquis, la réaction produite sur l'organisme tuberculeux garde une importance considérable au point de vue du diagnostic.

Le mode de préparation de la tuberculine fut gardé secret au début. Pour quel motif ? On ne le sait pas au juste, mais c'est un exemple d'autant plus regrettable qu'il venait d'une aussi haute autorité scientifique. Guidés par le développement de l'odeur spéciale aux milieux glycérinés, Budjwid (3), Roux et Metschnikoff parvinrent à préparer un produit identique à celui de Koch.

Le mode de préparation à mettre en œuvre est le suivant : Les cultures sont faites en bouillon glycériné à 6 p. 100 dans des ballons à large surface ou munis de liquide à moitié ; ensemencées comme il a été dit page 569, de manière à obtenir un beau voile, elles sont laissées six semaines à l'étuve à 37° ; il s'est formé un voile épais à la surface. Ces cultures sont stérilisées à l'autoclave à 110°, puis concentrées au bain-marie jusqu'à réduction au dixième. On filtre et l'on conserve en vase clos, à l'abri de la lumière. La forte proportion de glycérine, 60 p. 100, assure la bonne conservation.

Ainsi préparée, la tuberculine est un liquide brunâtre, sirupeux, dégageant une faible odeur de pommes rainettes.

(1) Marmorek, Resorption toter Tuberkelbacillen (*Berlin., klin. Wochenschr.*, 1906, p. 1179).

(2) Koch, Weitere Mittheilungen über ein Heilmittel gegen T. (*Deutsche med. Wochenschr.*, 13 novembre 1890).

(3) Budjwid, La tuberculine ; sa préparation, ses effets (*Arch. des sc. biol. de Saint-Pétersbourg*, I, 1891, p. 213).

Pour préparer une tuberculine active, il est nécessaire de partir d'une culture nettement virulente. D'après les observations de Krompecher (1), un Bacille peu virulent, et à plus forte raison avirulent, forme une tuberculine qui ne donne pas la réaction caractéristique, ou, du moins, ne la produit qu'à des doses bien supérieures à celles qui sont d'habitude employées. Il est donc nécessaire de s'assurer auparavant de l'activité de la culture en l'inoculant dans le péritoine d'un cobaye ou dans les veines d'un lapin.

Dès le début, Koch avait affirmé l'identité des tuberculines de provenance humaine ou bovine. Il paraît bien établi qu'on peut indifféremment se servir, pour préparer de la tuberculine, d'un Bacille humain ou d'un Bacille bovin, pourvu que sa virulence soit très marquée pour le cobaye. Wolbach et Ernst (2) concluent, de nombreuses expériences, que les tuberculines obtenues de Bacilles humains et de Bacilles bovins ont des effets identiques sur les cobayes tuberculeux. Pour Wolf-Eisner (3), il y aurait cependant quelques différences dans le mode de réaction. Cette identité ou grande similitude d'effets viendrait à l'appui de l'opinion de l'unité spécifique des deux types.

Pour la tuberculine obtenue à l'aide du Bacille aviaire, les résultats sont beaucoup moins nets. Straus dit que son action est identique : mais beaucoup d'observateurs trouvent sa toxicité pour le cobaye tuberculeux beaucoup moindre, les réactions qu'elle détermine moins intenses; souvent même elle se montre tout à fait inactive.

Les effets produits par la tuberculine fournie par le Bacille pisciaire sont plus douteux encore. Ramond et Ravaud (4), Ledoux-Lebard (5), Terre (6), disent bien avoir observé une action hyperthermisante analogue à celle de la tuberculine vraie, mais seulement avec des quantités beaucoup plus fortes de produits, 2 centimètres cubes au moins, chez le cobaye tuberculeux. D'autres observateurs (7) n'ont, par contre, rien remarqué qui puisse être regardé comme ayant un caractère réellement spécifique.

Les produits similaires obtenus avec divers Bacilles acido-résistants, paratuberculeux, ont donné tantôt des résultats tout à fait négatifs, tantôt des phénomènes se rapprochant de ceux observés avec la tuberculine vraie (8). Cette question sera exposée plus loin

On a fait jusqu'ici de nombreuses recherches pour extraire le principe actif de la tuberculine, sans parvenir à de bons résultats. Koch, en

(1) Krompecher, Recherches sur le traitement des animaux tuberculeux par la méthode de Landerer et sur la virulence des Bacilles tuberculeux (*Ann. de l'Inst. Pasteur*, XIV. 1900, p. 723).

(2) Wolbach et Ernst, Experiments with tuberculine made from human and bovine tubercle Bacilli (*Journ. of med. Research*, XII, 1904, p. 295).

(3) Wolf-Eisner, Die differenzierenden Kutantuberkulinreaktionen (*Wiener klin. Wochenschr.*, 1908).

(4) Ramond et Ravaud. Sur une nouvelle tuberculine (*C. R. de la Soc. de Biol.*, 1898, p. 597).

(5) Ledoux-Lebard, Le Bacille pisciaire (*Ann. de l'Inst. Pasteur*, XIV, 1900, p. 535).

(6) Terre, Essai sur la tuberculose des vertébrés à sang froid. Thèse de Lyon, 1902.

(7) Bobrel, Bacilles tuberculeux et paratuberculeux (*Bull. de l'Inst. Pasteur*, II, 1904, p. 465).

(8) Trimescu, Action comparée des paratuberculines (*Soc. de Biol.*, 4 nov. 1905).

la précipitant par l'alcool à 66 p. 100, et lavant le précipité à l'alcool absolu, obtient un précipité blanc floconneux, soluble dans l'eau et la glycérine, quarante fois plus actif que la tuberculine brute; il le nomme *tuberculine purifiée*. C'est un produit de nature albuminoïde, mais il est complexe; d'après Kühne (1), il présente les réactions des albumoses et spécialement des deutéro-albumoses. Du reste, la matière albuminoïde peut n'être que le support du principe actif indéterminé qui n'existerait qu'en proportions excessivement minimes. Kühne, avec des milieux sans albuminoïdes, obtient des traces d'une matière albuminoïde qui paraît douée d'une grande toxicité.

D'après Arloing et Descas (2), à côté des toxines proprement dites, dans la tuberculine, existeraient des toxones ne produisant que des symptômes d'empoisonnement lent, pour ainsi dire chronique.

En plus des principes actifs, la tuberculine contient tout ce qui est soluble dans la glycérine, des matières extractives, des pigments, des sels minéraux.

En tout cas, le principe actif, ou les principes actifs, de la tuberculine ont des effets très curieux sur l'organisme. Introduite à doses minimes dans un organisme sain, la tuberculine n'y produit aucun trouble ou un trouble minime surtout caractérisé par l'hyperthermie; l'organisme tuberculeux, au contraire, réagit fortement.

Le cobaye sain supporte facilement, sans troubles, une injection sous-cutanée de 2 centimètres cubes de tuberculine ; un demi-centimètre cube suffit pour faire périr en peu de temps, quelques heures, un cobaye tuberculeux. La sensibilité du cobaye tuberculeux s'accroît du reste progressivement avec l'évolution de l'infection ; au bout de trois jours, il réagit déjà fortement à l'inoculation d'une dose de 50 milligrammes: cette dose est mortelle au vingtième jour; après vingt-cinq à trente jours, 10 milligrammes, 5 milligrammes et même 1 milligramme suffisent pour amener la mort. A l'autopsie, on trouve surtout de fortes lésions congestives autour des foyers tuberculeux des divers organes. D'après Maragliano (3), chez le cobaye sain l'empoisonnement est foudroyant avec $1^{gr},25$ de tuberculine pour 100 grammes de poids du corps, lent avec $0^{gr},50$. Par contre, Borrel (4) a vu qu'en inoculation intracérébrale la tuberculine tuait le cobaye sain à dose très faible, 3 à 4 milligrammes. Chez le cobaye tuberculeux, par la même voie, il suffit de doses extrêmement minimes, $1/10^e$ de milligramme au douzième jour, $1/100^e$ vers le trentième jour, même $1/1000^e$ au quarantième jour. L'ingestion au cobaye sain de doses assez fortes, $2^{gr},50$ à 5 grammes, occasionne l'amaigrissement et une mort assez rapides, d'après Calmette et Breton (5).

(1) Kühne, Erfahrungen über Albumosen und Peptone (*Zeitschr. für Biol.*, XXIX, 1892, p. 26, et XXX, 1893, p. 221).

(2) Arloing et Descas, Des toxines de la tuberculine et de leur influence sur le développement de la tuberculose expérimentale (*Journ. de physiol.*, IV, 1902, p. 139).

(3) Maragliano, Sur l'empoisonnement par la tuberculine (*Soc. de Biol.*, 27 mars 1897).

(4) Borrel, Action de la tuberculine et de certains poisons bactériens sur le cobaye sain ou tuberculeux par inoculation sous-cutanée ou intracérébrale (*Soc. de Biol.*, 7 avril 1900).

(5) Calmette et Breton, Sur les effets de la tuberculine absorbée par le tube digestif chez les animaux sains et les animaux tuberculeux (*C. R. de l'Acad. des sc.*, 19 février 1906).

Le lapin sain supporte bien une injection intraveineuse de 5 centimètres cubes de tuberculine ; il présente pendant un ou deux jours une hyperthermie de 1° à 1°,5 et maigrit un peu, mais se remet vite. Un chien sain peut recevoir une dizaine de centimètres cubes sans autre inconvénient qu'un peu de fièvre ; les bovidés sains résistent mieux encore, les volailles également. Si ces animaux sont en puissance de tuberculose, il se produit même, après injection de doses bien moindres, une réaction très forte, surtout une hyperthermie très marquée, atteignant souvent 41° et 42° ; lorsque la dose injectée est forte, la mort survient assez rapidement.

L'homme, qui paraît un milieu moins favorable pour le *Bacille de la tuberculose* que le cobaye, est beaucoup plus sensible que lui aux produits formés par ce microbe. Chez l'homme adulte sain, un vingtième de centimètre cube provoque déjà des troubles sérieux, un quart de centimètre cube amène des troubles intenses, inquiétants. Koch, en s'injectant un quart de centimètre cube ($0^{cc},25$) ressentit d'assez fortes douleurs abdominales, eut de la dyspnée, de la tendance à la toux, des vomissements, de l'abattement et de la fièvre (39°,6) ; après douze heures, la température s'abaissa et revint à la normale le jour suivant. Straus fixe à 1 centième de centimètre cube la dose minima encore active chez l'homme sain ; cette dose détermine un peu d'abattement et une très légère élévation de température, 38° ou très peu plus.

Chez l'homme tuberculeux adulte, cette dernière dose de 1 centième de centimètre cube détermine des troubles très marqués, une réaction générale et une réaction locale aux endroits où se trouvent des foyers tuberculeux. La réaction générale débute par un frisson, puis l'hyperthermie se produit, 39°, 40°, et même 41° ; on observe de l'abattement, des courbatures. L'accès commence ordinairement quatre ou cinq heures après l'injection et dure douze ou quinze heures ; puis tout rentre dans l'ordre.

L'action locale de la tuberculine sur les lésions tuberculeuses est très remarquable. On peut facilement l'observer dans le cas de tuberculose externe ou de lupus. Il se produit au voisinage des lésions une inflammation intense, parfois même appréciable avant le frisson du début ; on trouve aux alentours un exsudat très riche en leucocytes ; le foyer tuberculeux peut ainsi être peu à peu isolé et se nécroser, être éliminé quand il s'agit de lupus, par exemple. Dans les lésions viscérales, cette élimination ne peut pas se faire. Cet effet ne peut se produire que sur les lésions tuberculeuses vivantes ; il ne se produit pas sur les masses caséeuses ou le tissu tuberculeux mortifié. Les *Bacilles tuberculeux* existant dans les lésions sont influencés et peuvent être mobilisés ; d'où possibilité d'une généralisation dans le cas de désagrégation d'une lésion interne à la suite de l'action de la tuberculine, ou réveil d'anciens foyers éteints ou en voie de régression.

Chez les adultes affaiblis, il faut employer une dose réduite ; chez les enfants de trois à cinq ans, Koch conseille un millième de centimètre cube, et moitié de cette quantité chez les enfants très affaiblis.

On sait ce qu'est devenue la soi-disant puissance curative de la tuberculine et comment s'est évanouie la grande espérance qu'elle avait fait naître. Il reste cependant la constatation facile de la réaction qu'elle produit sur l'organisme tuberculeux. C'est, nous le verrons, un point

de la plus haute importance pour le diagnostic de la tuberculose.

Essai de la tuberculine. — Pour obtenir les effets cherchés, il faut disposer d'une tuberculine suffisamment active. Comme il a été dit plus haut (p. 713), les cultures bien virulentes seules donnent un bon produit; ce sont les seules qu'il faut employer pour la préparation, après avoir essayé leur activité par l'inoculation au cobaye. Malgré cela, il est nécessaire, après la préparation, d'essayer l'activité du produit obtenu. Pour qu'une tuberculine puisse être considérée comme active, il faut, d'après Koch, que l'injection sous-cutanée d'un demi-centimètre cube détermine, en un laps de temps de six à trente heures, la mort d'un cobaye nettement tuberculeux. La tuberculose de ce cobaye a été occasionnée par l'inoculation de produits virulents, au mieux d'une culture bien virulente; le moment à choisir pour l'injection de tuberculine est trois ou, mieux, quatre semaines après l'inoculation. Pour apprécier plus exactement la valeur de la tuberculine, on peut injecter, à d'autres cobayes tuberculeux, des doses plus faibles que la précédente, descendre même jusqu'à un dixième ou un vingtième de centimètre cube. Si la mort survient, la tuberculine peut être alors considérée comme très active.

Sous le nom de *Nouvelle tuberculine*, Koch a désigné une sorte de tuberculine purifiée, ne contenant que certains principes de la tuberculine brute, ceux précipitables par l'alcool. Il l'obtenait d'abord en laissant tomber goutte à goutte de la tuberculine dans 20 à 25 fois son poids d'alcool absolu. Il se forme un précipité granuleux qui, lavé à l'alcool absolu, donne par dessiccation une poudre blanche, très soluble dans l'eau, représentant environ 10 p. 100 de la tuberculine employée. Il en vint ensuite à traiter la tuberculine brute par l'alcool à 60°, laver le précipité à l'alcool absolu et dessécher dans le vide. La poudre blanche obtenue aurait des effets 50 fois plus forts que la tuberculine brute. Elle se dissout dans la glycérine en donnant une solution stable, alors que la solution aqueuse se décompose vite.

Koch (1) a postérieurement essayé et préconisé l'emploi d'autres produits similaires, mais plus complexes, contenant, à côté des substances diffusibles, des endotoxines des corps microbiens auxquelles il a également appliqué la dénomination générale de tuberculines.

Il a préparé une *Tuberculine alcaline* (TA) en traitant des Bacilles virulents par une solution de soude caustique à 1 p. 10. Les Bacilles sont intimement mélangés au réactif et laissés pendant trois jours à la température de la chambre en agitant fréquemment. Au bout de ce temps, tous sont morts; l'expérience démontre que le *Bacille de la tuberculose* périt au bout de douze à quinze heures dans cette lessive de soude à 1 p. 10. Le liquide surnageant est filtré au papier, puis neutralisé. On obtient un liquide clair, légèrement jaunâtre, qui renferme encore pas mal de *Bacilles tuberculeux*, car, en faisant des préparations par les méthodes ordinaires, on en trouve souvent cinq ou six dans un champ de microscope. Ce liquide donne des réactions analogues à celles que produit la tuberculine ordinaire, mais ces réactions ont une durée un peu plus longue; l'injection donne souvent lieu à des abcès à pus stérile, dus à la présence de *Bacilles tuberculeux* morts, ou des matières

(1) Koch, Ueber neue Tuberkulinepräparate (*Deutsche med. Wochenschr.*, 1897, nº 14, p. 209).

grasses dont il a été parlé plus haut, dissoutes en partie à la faveur de l'alcali. En filtrant sur bougie d'alumine, on élimine tous les cadavres de Bacilles, mais le liquide obtenu ne serait pas plus actif que la tuberculine ordinaire.

Koch eut alors l'idée de détruire mécaniquement les corps bacillaires pour arriver à obtenir une résorption complète du contenu par l'organisme et en particulier éliminer la couche formée d'acides gras qui semble protéger le microbe contre la résorption. Les cultures sont desséchées et broyées longtemps dans un mortier d'agate jusqu'à ce que l'examen ne montre plus qu'une petite quantité de Bacilles intacts. Inutile de faire ressortir le danger extrême que peut faire courir une telle opération, pour laquelle on prendra des précautions toutes spéciales.

La substance ainsi obtenue est diluée dans de l'eau distillée et soumise à la centrifugation à l'aide d'un appareil faisant 4000 tours à la minute, maintenue pendant une demi-heure à trois quarts d'heure. L'émulsion est alors divisée en deux couches distinctes : une supérieure blanchâtre et opalescente, mais tout à fait transparente et ne contenant plus de Bacilles; l'autre inférieure boueuse, adhérente au vase. La couche supérieure est soutirée et mise à part; la couche inférieure est desséchée, triturée à nouveau, puis soumise comme ci-dessus à la centrifugation ; elle donne de même une couche supérieure transparente, et un résidu épais, sur lequel on peut encore plusieurs fois renouveler l'opération. La masse presque entière de la culture peut ainsi être transformée en une série de couches liquides transparentes. Le résidu définitif est très minime.

Le liquide transparent obtenu à la suite de la première centrifugation se distingue essentiellement de ceux qui sont obtenus après les centrifugations suivantes, qui, eux, jouissent des mêmes propriétés.

Koch le désigne sous le nom de *Tuberculine O* (TO), et sous le nom de *Tuberculine R* (TR) celui provenant des autres opérations successives. TO ne se modifie pas par l'addition de 50 p. 100 de glycérine ; tandis que TR donne, dans les mêmes conditions, un précipité floconneux blanc. TR contient surtout les substances constitutives du Bacille qui sont solubles dans la glycérine ; tandis que TO renferme les substances insolubles dans ce réactif. Les effets provoqués par ces deux liquides chez les animaux et l'homme sont aussi très différents.

TO, par son action, se rapproche beaucoup de la tuberculine ordinaire et correspond presque entièrement à la tuberculine alcaline TA, sauf que son inoculation ne donne jamais d'abcès. Mais les qualités immunisantes de TO sont peu marquées, tandis que celles de TR sont manifestes ; TR contient toutes les substances immunisantes des cultures. En inoculant de très petites doses de TR à l'homme, de manière à éviter de produire une réaction, il est possible de l'immuniser contre TR ; et alors le sujet ne réagit plus aux fortes doses de tuberculine ordinaire et de TO ; il est donc immunisé à l'égard de tous les produits constitutifs du *Bacille tuberculeux*.

Pour que TR puisse produire son action intégrale, il faut absolument partir d'une culture bien virulente. Les cultures peu virulentes ne fournissent qu'un produit défectueux. Ces cultures ne doivent pas être trop vieilles: la dessiccation se fera dans le vide ; il faut en général

éviter toutes les causes de modification, la lumière en particulier.

Le liquide TR, tel qu'il est livré, contient 20 p. 100 de glycérine ajoutée dans un but de conservation, quantité insuffisante pour précipiter les substances actives. Il contient, par centimètre cube, 10 milligrammes de substance solide. Pour l'utiliser, on le dilue suffisamment avec de l'eau glycérinée à 20 p. 100. On commence par des doses très faibles, 1/500e de milligramme, avec une injection tous les deux jours en augmentant lentement la dose de façon à éviter autant que possible plus d'un demi-degré d'hyperthermie. Ce n'est guère que lorsqu'on arrive aux doses de 1/2 à 1 milligramme que l'on peut constater des effets immunisants. Koch dit arriver d'ordinaire, petit à petit, à des doses de 20 milligrammes sans produire d'accidents appréciables.

D'après lui, on obtiendrait chez tous les malades une amélioration considérable, bien plus notable qu'avec la tuberculine ordinaire, pouvant parfois être considérée comme une guérison.

Beaucoup de cliniciens, par contre, disent n'avoir obtenu aucun résultat avec TR ou seulement des améliorations minimes ou passagères.

Enfin, Koch (1) a désigné sous le nom de *Tuberculine B. E.* (Bacillen-emulsion) un mélange à parties égales de glycérine et d'une émulsion dans l'eau, en proportion de 1 p. 100, de Bacilles tuberculeux très finement broyés pendant longtemps.

Tuberculine de Denys. — Denys (2) préconise, comme tuberculine, le produit du filtrage, sur bougie de porcelaine, des bouillons de culture du Bacille, sans autre manipulation ni chauffage, avec seule addition d'un peu d'acide phénique ou de thymol pour assurer la conservation. Les effets observés sont très semblables à ceux que produit l'ancienne tuberculine de Koch.

Tuberculine de Maragliano. — Maragliano (3) prépare une *tuberculine aqueuse* en prenant la masse bacillaire d'une culture sur bouillon glycériné et en la faisant macérer pendant quarante-cinq heures, à une température de 95° à 100° au bain-marie, dans une quantité d'eau distillée égale au liquide de culture qu'a donné la filtration, en remplaçant l'eau au fur et à mesure que l'évaporation réduit le volume. Au bout de vingt-quatre heures de repos, on évapore au dixième au bain-marie. Ce liquide aurait les mêmes propriétés biologiques que la tuberculine ordinaire de Koch. La concentration au dixième tue d'habitude le cobaye sain dans la proportion de 1 centimètre cube pour 100 grammes de poids ; $0^{cc},10$ à $0^{cc},20$ suffisent pour tuer le cobaye tuberculeux en quarante-huit heures. L'alcool précipite, de cette tuberculine aqueuse, une substance qui tue le cobaye à 1 p. 25000 et le lapin, par injection intraveineuse, à 1 p. 33000. Maragliano se sert de cette tuberculine pour obtenir une certaine immunisation d'animaux, en vue de la production d'un sérum spécifique.

Tuberculine de Béraneck. — Dans un but thérapeutique, Béraneck (4)

(1) Koch, Ueber die Agglutination der Tuberkelbacillen und über die Verwerthung dieser Agglutination (*Deutsche med. Wochenschr.*, 1901, n° 48, p. 829).

(2) Denys, De l'action curative des bouillons filtrés du Bacille tuberculeux dans la tuberculose pulmonaire (*Bull. de l'Acad. de méd. de Belgique*, 1902, n° 3, p. 153).

(3) Maragliano, Extrait aqueux des Bacilles de la tuberculose (*Soc. de Biol.*, 22 janvier 1898).

(4) Béraneck, Sur les tuberculines (*C. R. de l'Acad. des sc.*, 23 nov. 1903).

prépare sa tuberculine en mélangeant à parties égales un filtrat de culture de deux mois et demi, sur bouillon de veau, obtenu par macération à froid, glycériné à 5,6 p. 100 (basiotoxine TB), et un extrait spécial obtenu en faisant macérer pendant deux heures à 60° dans de l'acide orthophosphorique à 10 p. 100 (acidotoxine AT). Le produit contient par conséquent des endotoxines et des toxines diffusibles. La solution mère (tuberculine mère) est une dilution à 1/20; il en fait d'autres dilutions successives. Cette tuberculine est notablement moins toxique pour le cobaye que les tuberculines de Koch.

INOCULATION EXPÉRIMENTALE

La tuberculose peut être expérimentalement conférée, à l'aide de produits pathologiques ou de cultures virulentes, à un grand nombre d'animaux d'expériences. Les grands animaux domestiques, les singes, les chats, les lapins, les cobayes, les rats, les souris, bien des petits oiseaux, sont réceptifs à un haut degré; le chien, la chèvre, le mouton, la poule sont plus résistants, sans cependant être réfractaires.

Le lapin et le cobaye sont particulièrement sensibles, ce dernier surtout, qui mérite d'être regardé comme le véritable animal réactif de la tuberculose. Aussi, lorsqu'un cobaye résiste à une inoculation bien faite, il est possible d'affirmer que la matière inoculée ne renfermait pas de *Bacilles tuberculeux*, vivants ou virulents au moins. Le lapin résiste souvent aux Bacilles quelque peu atténués; avec les Bacilles virulents, il présente, au bout de deux mois, une tuberculose généralisée.

Le produit que l'on veut inoculer est ou bien un produit tuberculeux quelconque, matière tuberculeuse, crachats, lait, etc.; ou du produit d'une culture bien développée, que l'on a préalablement convenablement émulsionné dans un peu de solution physiologique.

Inoculation au cobaye. — L'inoculation de produits tuberculeux virulents d'origine humaine ou bovine détermine fatalement, chez le cobaye, l'évolution d'une tuberculose qui amène la mort dans un délai variable de deux semaines à deux ou trois mois. La durée de l'affection dépend surtout de la virulence du microbe inoculé et du mode d'inoculation. Les résultats sont beaucoup moins certains avec du Bacille aviaire; on n'obtient que de petites lésions locales ou rien du tout.

Inoculation sous-cutanée. — Le mode le plus simple et le plus fréquemment employé est l'*inoculation sous-cutanée*. Elle se fait soit en injectant, à l'aide d'une seringue, du produit dilué dans de l'eau, soit en faisant une boutonnière à la peau, boutonnière que l'on creuse avec une sonde cannelée, et y déposant une parcelle de la matière d'inoculation. La plaie se ferme très vite, puis du dixième au quatorzième jour il s'y forme une légère induration qui donne un petit ulcère torpide. Vers le dixième jour environ, on perçoit de l'induration des ganglions du lieu inoculé, ganglions inguinaux et cruraux si l'inoculation a été faite à la patte postérieure. Souvent l'animal commence à maigrir vers la troisième semaine et diminue de poids progressivement; cette perte de poids, régulière et graduelle, peut être regardée comme indice du résultat positif de l'infection. L'animal meurt de trois semaines à un mois d'ordinaire, quelquefois après un plus long temps, manifestement tuberculeux. En le sacrifiant de quinze jours à trois

semaines, on lui trouve déjà le plus souvent des lésions tuberculeuses évidentes. Le foie et la rate surtout ont augmenté de volume et présentent un grand nombre de petites granulations tuberculeuses si l'affection est au début, des lésions plus grandes, confluentes, caséeuses même si la maladie a eu le temps d'évoluer. Les ganglions voisins du point d'inoculation sont caséeux. C'est le *type Villemin* de la tuberculose (p. 686). Les Bacilles caractéristiques se retrouvent en grand nombre dans les lésions.

Inoculation intrapéritonéale. — En *injection intrapéritonéale*, l'évolution est un peu plus rapide et plus sûre ; cette voie est à recommander pour des produits peu virulents. Les lésions sont les mêmes. La mort survient d'habitude de deux à six semaines. Le péritoine est envahi par des tubercules.

Inoculation intraveineuse. — En *injection intraveineuse*, on obtient tantôt une tuberculose typique, tantôt une infection sans tubercules apparents, une infiltration tuberculeuse, le *type Yersin* de la tuberculose (p. 686), la septicémie tuberculeuse. C'est le mode d'inoculation qui réalise le plus sûrement l'infection générale de l'organisme. Lorsqu'il existe des tubercules, on peut en trouver dans tous les organes, en très grande nombre. La mort peut déjà survenir du dixième au quinzième jour.

Inoculation dans la chambre antérieure de l'œil. — L'*injection dans la chambre antérieure de l'œil* permet de suivre facilement l'évolution des lésions. Du quinzième au vingtième jour, l'iris se couvre de fines granulations tuberculeuses ; puis l'œil se gonfle et se trouble, suppure même parfois ; en même temps, les ganglions du cou se prennent, l'animal succombe peu après avec des lésions pulmonaires intenses.

Inoculation par ingestion. — L'*ingestion* de produits tuberculeux est un moyen infidèle; cependant, elle peut déterminer la tuberculose. De nombreuses expériences le prouvent.

D'après Calmette et Guérin (1), cette méthode réussirait toujours lorsqu'on fait ingérer les Bacilles très divisés, finement émulsionnés comme ils le sont dans le lait et les crachats. Un seul repas important suffit souvent; le résultat est plus assuré après plusieurs absorptions faites à quelques jours de distance. La mort ne survient qu'après un assez long temps ; les animaux conservent une bonne santé apparente pendant six semaines ou plus.

Inoculation par inhalation. — L'*inhalation* de cultures mélangées à des liquides que l'on pulvérise a aussi permis de produire la tuberculose expérimentale chez les animaux. Les lésions sont surtout pulmonaires.

Inoculation au lapin. — Le lapin est plus résistant que le cobaye ; l'évolution de la maladie est plus lente chez lui. Il est particulièrement sensible au Bacille bovin ; beaucoup moins au Bacille humain dont l'inoculation sous-cutanée principalement échoue souvent ou ne produit qu'une petite lésion locale. En inoculation intraveineuse, même avec 1 milligramme de culture de Bacille humain, on ne détermine souvent rien, ou de petites lésions discrètes ou insignifiantes du poumon ou du rein. Par contre, des doses bien moindres

(1) Calmette et Guérin, Origine intestinale de la tuberculose pulmonaire (*Ann. de l'Inst. Pasteur*, XIX, 1905, p. 601 ; XX, 1906, p. 353 et 609).

de Bacilles bovins causent toujours une tuberculose généralisée et la mort, en un ou deux mois. Le lapin est assez sensible au Bacille aviaire qui lui donne souvent une tuberculose à marche typique. Sauf ces observations, on observe des résultats très semblables à ceux que donne le cobaye. En inoculation sous-cutanée, il se produit d'abord un abcès local ; la généralisation se fait très tardivement, après trois ou quatre mois souvent, ou peut même manquer si la culture est peu virulente. En inoculation intraveineuse, la mort survient après un à deux mois avec une culture virulente ; on trouve les mêmes lésions que chez le cobaye.

Inoculation aux bovidés. — Les bovidés sont extrêmement sensibles au Bacille bovin, très sensibles aussi au Bacille humain à l'inoculation duquel ils résistent toutefois assez souvent.

Les jeunes individus, les veaux de lait particulièrement, sont bien plus facilement infectés que les adultes.

Inoculation sous-cutanée. — Chez le bœuf, il se forme, au point d'inoculation, un abcès qui s'ouvre au bout de quinze à vingt jours et donne une plaie ulcéreuse. La lésion peut rester locale, l'ulcère se cicatrise et c'est la guérison; ou progresser, gagner d'abord les ganglions du voisinage, puis se généraliser; l'animal meurt alors de tuberculose, surtout pulmonaire, dans un délai souvent assez long.

Inoculation intraveineuse. — C'est, d'après Nocard, le mode le plus sûr d'infection. L'injection de 10 centimètres cubes d'une émulsion de culture bovine bien virulente tue la vache en quinze jours avec des lésions miliaires généralisées.

Inoculation par ingestion. — L'infection s'obtient surtout bien chez le veau, par les voies digestives. Les adultes résistent assez souvent. C'est l'intestin grêle qui est la voie de pénétration suivie. Les mêmes observations sont à faire que pour le cobaye (p. 720).

Calmette et Guérin ont observé que les animaux n'ayant eu qu'une infection unique de moyenne intensité guérissent presque toujours ; alors que ceux qui ont été soumis à plusieurs absorptions successives, même de doses minimes ($0^{gr},10$ de culture), prennent tous une tuberculose grave à marche d'autant plus rapide que les réinfections sont plus fréquentes. L'infection est beaucoup plus assurée en faisant absorber les Bacilles finement émulsionnés.

Inoculation par inhalation. — La vache est facilement infectée par inhalation de poussières virulentes très fines ou de pulvérisations d'une émulsion virulente.

Inoculation dans la mamelle. — Chez la vache, la mamelle s'infecte facilement (1), à la suite d'injection d'émulsion virulente dans le canal du trayon. Les signes de mammite apparaissent après six à treize jours, la fièvre se déclare et la mort survient après trente jours environ. Les lésions sont localisées à la mamelle et aux ganglions voisins ; la mort serait à rapporter à une intoxication tuberculeuse.

Inoculation aux oiseaux. — Quelle que soit la méthode d'inoculation employée, on ne réussit pas la plupart du temps à transmettre

(1) Nocard, Mammite tuberculeuse expérimentale (*Recueil de méd. vétér.*, 1900, p. 721).

aux poules la tuberculose des mammifères. H. Martin (1) a cependant observé que les poules inoculées, sacrifiées après un temps assez long, jusqu'à sept mois et demi après l'infection, bien que ne montrant aucune lésion tuberculeuse, avaient conservé des Bacilles tuberculeux virulents dans leur sang; l'injection de ce sang rendait les cobayes tuberculeux. Nocard (2) est parvenu à occasionner des lésions tuberculeuses chez la poule, en lui inoculant, dans le péritoine ou dans les veines, des cultures de tuberculose des mammifères ayant passé, pendant trois ou quatre générations, par le péritoine des poules au moyen du procédé des sacs de collodion. Auclair (3), en inoculant des pigeons dans le péritoine avec des cultures de tuberculose humaine, les a vus succomber sans lésions tuberculeuses apparentes, mais avec des Bacilles dans les organes et jamais dans le sang. Cadiot, Gilbert et Roger (4) obtiennent, chez la poule, des résultats positifs très nets, avec formation de granulations tuberculeuses, en introduisant, après l'inoculation de cultures de tuberculose humaine dans la cavité abdominale, à plusieurs reprises 14 à 15 centimètres cubes de sérum de cheval; la mort survient en quelques mois. Toutefois, les mêmes auteurs (5) reconnaissent que les perroquets sont très réceptifs non seulement pour la tuberculose aviaire, mais encore pour la tuberculose humaine.

Inoculation aux vertébrés à sang froid. — La question est encore loin d'être résolue. Il semble cependant bien évident que les grenouilles, les tritons et certains poissons peuvent servir de terrain de culture au *Bacille de la tuberculose* et être infectés par lui. Mais les résultats obtenus ne sont pas concordants. Bataillon, Dubard et Terre (6) ont nourri des carpes avec des produits tuberculeux humains; au bout de huit jours, ils retrouvaient des Bacilles dans le foie. La virulence de ces Bacilles était tellement atténuée qu'après onze jours l'inoculation au cobaye ne donnait plus aucun résultat. L'inoculation sous-cutanée, chez la grenouille, de tuberculose humaine ou aviaire, leur a donné le même résultat. Ils en concluent que le passage à travers l'organisme des animaux à sang froid transforme les Bacilles humain et aviaire en véritables saprophytes. Nicolas et Lesieur (7), après avoir fait ingérer pendant sept mois à des carpes et des cyprins dorés des crachats tuberculeux, n'ont rien pu retrouver dans les organes, à l'examen microscopique, mais ont donné la tuberculose au cobaye par l'inoculation des muscles et de l'intestin de ces poissons. Auché et Hobbs (8)

(1) H. Martin, Recherches ayant pour but de prouver qu'après un séjour variable dans un organisme réfractaire, les microbes tuberculeux peuvent conserver encore à des degrés divers leurs propriétés infectieuses (*Revue de la T.*, 1888, p. 362).

(2) Nocard, Sur les relations qui existent entre la T. humaine et la T. aviaire (*Ann. de l'Inst. Pasteur*, XIII, 1898, p. 561).

(3) Auclair, La T. humaine chez le pigeon (*Arch. de méd. expér.*, IX, 1897, p. 277).

(4) Cadiot, Gilbert et Roger, De la transmission aux gallinacés de la T. des mammifères (*Soc. de Biol.*, 19 novembre 1898).

(5) Cadiot, Gilbert et Roger, Sur l'inoculabilité de la tuberculose aviaire aux psittacés (*Soc. de Biol.*, 1898, p. 1113).

(6) Bataillon, Dubard et Terre, La forme saprophytique de la T. humaine et de la T. aviaire (*C. R. de l'Acad. des sc.*, 1897, p. 1399).

(7) Nicolas et Lesieur, Effets de l'ingestion de crachats tuberculeux humains chez les poissons (*Soc. de Biol.*, 7 octobre 1899).

(8) Auché et Hobbs, Virulence de la T. humaine après son passage à travers la grenouille (*Soc. de Biol.*, 8 janvier 1898). — Id., Action de la T. morte injectée dans la cavité péritonéale des grenouilles (*Ibid.*, 30 octobre 1897).

ont obtenu des granulations tuberculeuses sur le foie et le mésentère de grenouilles inoculées dans le péritoine avec de la tuberculose humaine de vingt à soixante jours auparavant. Des cobayes inoculés avec ces granulations ont présenté une tuberculose généralisée typique ; mais la virulence semblait être moindre pour les produits ayant séjourné le plus longtemps chez la grenouille. Ces mêmes expérimentateurs ont constaté que les cultures de tuberculose humaine et aviaire, tuées par un chauffage de vingt minutes à 120°, déterminaient chez les grenouilles des lésions semblables à celles occasionnées chez ces animaux par les cultures vivantes, jusqu'au trente-troisième jour après l'inoculation ; on trouvait, sur la surface du foie et du mésentère, des granulations tuberculeuses à structure identique à celle des granulations de tuberculose vivante, avec de gros amas bacillaires au centre, conservant jusqu'au trente-troisième jour ou un peu plus leurs réactions colorantes. Plus tard, les Bacilles ne sont plus reconnaissables. D'autres recherches démontrent également la possibilité de l'infection des grenouilles par la tuberculose des mammifères, soit avec production de lésions spéciales, soit sans lésions apparentes (1).

D'après Ramond et Ravaud (2), les grenouilles sont beaucoup plus sensibles au Bacille aviaire et à sa toxine qu'aux Bacilles de l'homme ou des poissons et à leurs produits.

Moeller (3), en inoculant des crachats tuberculeux à un orvet, a obtenu des tubercules dans la rate et le foie. Les Bacilles obtenus de ces lésions reproduisaient le type pisciaire (4).

Bertarelli et Bocchia (5) ont obtenu des résultats positifs chez des cyprins inoculés avec des Bacilles des trois variétés, humaine, bovine et aviaire. Des amas de Bacilles se trouvaient dans tous les organes qui parfois présentaient des lésions nodulaires assez nettes, sans cellules géantes. Ces Bacilles, prélevés après huit mois, conservaient toute leur virulence originelle pour le cobaye, à l'inverse de ce qu'avaient obtenu Sorgo et Suess (6), une atténuation bien marquée.

Le *Bacille tuberculeux pisciaire* donne des résultats d'inoculation positifs chez beaucoup de vertébrés à sang froid : les carpes, divers cyprins, les tritons, les grenouilles, les crapauds, les tortues, les orvets, les couleuvres, les vipères (7).

Inoculation à l'homme. — L'homme paraît aussi pouvoir gagner la

(1) Lubarsch, Der Einfluss des Organismus Kaltblütiger Tiere auf den Bacillus des Menschlichen Tuberkulose (*Centralbl. für Bakt.*, XXVII, 1900, p. 710). — Herzog, Zur Tuberkulose im Kaltblüterorganismus (*Ibid.*, XXXI, Originale, 1902, p. 78).

(2) Ramond et Ravaud, Virulence du Bacille tuberculeux aviaire vis-à-vis des animaux à sang froid (*Soc. de Biol.*, 28 mai 1898).

(3) Moeller, *Deutsche. med. Wochenschr.*, 1894.

(4) Bataillon, Moeller et Terre, Ueber die deutität des Bacillus des Karpfens (Bataillon, Dubard et Terre) und des Bacillus des Blindschleiche (Moeller) (*Zeitschr. für Tuberkulose*, III, 1902, p. 467).

(5) Bertarelli et Bocchia, Nuove ricerche sulla tubercolosi dei vertebrati a sangue freddo (*La Tuberculosi*, 1910).

(6) Sorgo et Suess, Ueber Versuche mit Tuberkelbacillenstämmen menschlicher Herkunft an Schlangen und Blindschleichen und über Mutation menschlicher Tuberkelbacillen (*Centralbl. für Bakt.*, Originale, XLIII, 1906, p. 422).

(7) Dubard, La tuberculose des animaux à sang froid (*Revue de la T.*, 1898). — Ledoux-Lebard, Le Bacille pisciaire et la tuberculose de la grenouille due à ce Bacille (*Ann. de l'Inst. Pasteur*, XIV, 1900, p. 535).

tuberculose expérimentale; c'est ce qui semble résulter d'accidents arrivés à des expérimentateurs maniant le *Bacille tuberculeux*. Les lésions observées sont souvent uniquement des lésions locales, des tubercules cutanés, l'inoculation ayant été faite à la peau ; c'est ce que l'on observe surtout chez les médecins, principalement à la suite de piqûre anatomique, chez les vétérinaires, les bouchers; c'est le *tubercule anatomique*. Il peut se produire cependant une généralisation et la tuberculose pulmonaire. Les produits désséchés peuvent infecter par inhalation; c'est la tuberculose pulmonaire d'emblée. Ce sont des raisons suffisantes pour recommander les plus grandes précautions et une extrême prudence quand on manipule de tels produits.

La tuberculose expérimentale reproduit les lésions que l'on observe dans la tuberculose spontanée de l'homme ou des animaux. On y trouve le plus souvent les granulations tuberculeuses typiques; d'autres fois, l'absence de lésions apparentes, l'infiltration des organes par les *Bacilles de la tuberculose*.

Dans tous les cas, le poumon est un véritable *locus minoris resistantiæ* pour la tuberculose; c'est le plus souvent le premier et parfois le seul organe atteint.

La propagation se fait le plus souvent par la voie lymphatique, du point d'inoculation vers l'intérieur, dans l'inoculation sous-cutanée, intraséreuse, intra-oculaire, intestinale; les ganglions de la région d'inoculation sont virulents en trois ou quatre jours. Elle peut se faire aussi par voie sanguine, comme le démontrent les résultats de l'inoculation intraveineuse ; elle est alors générale d'emblée.

D'après les recherches de Borrel (1), la cellule tuberculeuse est toujours une cellule lymphatique ; les cellules fixes de l'organe servent de simple support passif.

La rapidité plus ou moins grande avec laquelle l'infection expérimentale évolue dépend de plusieurs conditions, inhérentes à la fois aux individus pris comme terrains et à la qualité de la matière d'ensemencement. Elle dépend aussi, dans une large mesure, de la quantité de Bacilles introduits dans l'organisme. Il en est de même de la dilution des Bacilles; plus ils se trouvent dilués dans un véhicule, plus l'infection évolue lentement, à quantités égales ou à peu près de microbes.

Tous les organes peuvent être atteints dans le cas de tuberculose expérimentale généralisée. Les organes génitaux mâles ou femelles le sont souvent : c'est un point de grande importance pour la question si discutée de l'*hérédité de la tuberculose*.

Des faits expérimentaux en assez grand nombre démontrent que des femelles tuberculeuses peuvent donner des petits tuberculeux; l'existence de la *tuberculose congénitale* expérimentale ne peut pas être niée; elle concorde, du reste, avec des observations cliniques bien assurées, faites sur l'homme ou les animaux domestiques.

Les expériences de Nocard montrent que les veaux nés de mères tuberculeuses réagissent très rarement à la tuberculine. Le taux de la tuberculose chez les veaux de boucherie est d'ailleurs très réduit,

(1) Borrel, T. pulmonaire expérimentale (*Ann. de l'Inst. Pasteur*, VII, 1893, p. 593).

3,3 p. 1000 d'après Bang, et encore beaucoup de ceux qui sont atteints ont-ils pu aisément être contaminés après la naissance.

D'après Landouzy et Martin (1), cette transmission de la tuberculose au fœtus devrait être considérée comme se produisant fréquemment. Les expériences répétées un grand nombre de fois par d'autres expérimentateurs, surtout par Nocard, Straus, Sanchez-Toledo (2), Gaertner (3), démontrent que cette transmission doit être tenue pour très rare, même tout à fait exceptionnelle. Ce qui peut être transmis plus probablement, c'est une prédisposition plus ou moins grande à l'infection, une résistance moindre à l'égard du virus; les recherches de Carrière (4) montrent que cette prédisposition peut être déterminée par les seuls poisons tuberculeux inoculés aux parents, surtout à la mère.

Les expériences de Koubassoff (5) faisaient admettre le passage facile des Bacilles de la tuberculose à travers le placenta. Celles beaucoup mieux faites de Sanchez-Toledo et d'Arrigo (6) prouvent que ce passage est possible, mais tout au moins rare et qu'il faut alors des lésions placentaires pour que l'infection du fœtus se produise. Ces lésions sont rares au début de la grossesse, comme on le remarque expérimentalement chez le cobaye; on les trouve facilement dans la seconde moitié, où l'examen histologique fait reconnaître des Bacilles de Koch dans le placenta et dans le foie des fœtus.

La contagion du fœtus se fait par la veine ombilicale; c'est ce qui explique pourquoi, dans cette tuberculose congénitale, le foie est particulièrement atteint, le poumon rarement.

La transmission de la tuberculose directement par le père est beaucoup plus problématique encore. Ici, c'est le sperme seul qu'on peut incriminer; il faut admettre que le spermatozoïde fécondateur apporte à l'ovule un Bacille virulent. Des expériences très précises de Gaertner démontrent que le sperme d'un animal tuberculeux peut contenir des Bacilles, quoique exceptionnellement et en petit nombre. Malgré cela, toutes les expériences de fécondation de femelles saines par des mâles manifestement tuberculeux et à tuberculose testiculaire bien nette, ont donné constamment des résultats négatifs relativement à l'infection de l'ovule par du sperme tuberculeux. Gaertner a pu cependant nettement constater que des femelles ayant reçu des mâles tuberculeux prenaient parfois la tuberculose; c'est la démonstration expérimentale de l'infection possible par la cohabitation, déjà admise en clinique. Certaines expériences de Friedmann (7) paraissent cependant démontrer que les Bacilles tuberculeux pourraient être directement apportés par le sperme sans l'intermédiaire des organes maternels.

(1) LANDOUZY et H. MARTIN, Faits pour servir à l'hérédité de la T. (*Revue de méd.*, 1883, p. 1014).

(2) SANCHEZ-TOLEDO, Rech. expér. sur la transmission de la T. de la mère au fœtus (*Arch. de méd. expér.*, 1889, p. 511).

(3) GAERTNER, Ueber die Erblichkeit der T. (*Zeitschr. für Hygiene*, XIII, 1893, p. 101).

(4) CARRIÈRE, Recherches expérimentales sur l'hérédité de la T. Influence des poisons tuberculeux (*Arch. de méd. expér.*, XII, 1900, p. 782).

(5) KOUBASSOFF, Passage des microbes pathogènes de la mère au fœtus (*C. R. de l'Acad. des sc.*, C, 1885, p. 172, et CI, p. 451).

(6) D'ARRIGO, Beitrag zum Studium der erblichen Uebertragung der Tuberkulose durch die Placenta (*Centralbl. für Bakt.*, XXVIII, 1900, p. 683).

(7) FRIEDMANN, *Deutsche med. Wochenschr.*, 28 février 1901.

Les expériences de Maffucci (1) montrent qu'il faut en outre tenir compte de l'apport de toxine tuberculeuse par le sperme. Il se produirait souvent ainsi une véritable intoxication pouvant occasionner l'avortement et même un état de cachexie grave chez la femelle, sans lésions tuberculeuses; les produits peuvent aussi être impressionnés de la même manière et présenter des signes de dégénérescence, surtout une mortalité précoce.

En somme, tout plaide plutôt contre l'infection directe de l'ovule avant la conception ou au moment de la fécondation, très prônée, surtout par Baumgarten (2), et qui nécessite alors la conservation du virus à l'état de vie latente, de microbisme latent, dans l'organisme à ses débuts; la tuberculose congénitale, quand elle se produit, est surtout d'origine maternelle et provient d'une contamination directe du fœtus par le placenta présentant des lésions tuberculeuses.

IMMUNITÉ ET SÉROTHÉRAPIE

Depuis la découverte du *Bacille de la tuberculose* par Koch, il a été fait de très nombreuses recherches dans le but surtout de découvrir une thérapeutique spécifique efficace de la tuberculose.

Il y a sur ce point une abondance prodigieuse de matériaux dont beaucoup ont malheureusement servi à établir des déductions trop hâtives. Malgré tout, on se trouve forcé de reconnaître que le véritable traitement spécifique de cette infection est encore à trouver.

Il y a cependant des points intéressants acquis, qui permettent d'espérer voir un jour la question plus ou moins résolue. C'est surtout la possibilité d'obtenir, dans des conditions variées, un certain degré d'immunité, une immunité relative, ou peut-être seulement une résistance plus ou moins durable à l'infection, si on ne peut pas encore affirmer un état d'immunité véritable. On a, sous ce rapport, des indications déjà précieuses, plutôt qu'une manière de faire nettement arrêtée. Il reste à compléter et fixer les méthodes, à les rendre sûres et constantes, surtout pratiques et sans danger.

Les nombreux essais tentés mettent en œuvre, les uns des microbes vivants, les autres seulement des produits qui en proviennent.

La question peut être envisagée à deux points de vue bien distincts.

Ou bien l'on recherche une *vaccination*, qui ne peut guère avoir qu'un but préventif, mettre l'individu sur lequel on opère en état de résister à l'infection. Ou bien on veut obtenir une *immunisation active* suffisante pour que l'organisme produise des quantités d'anticorps suffisantes pour les utiliser dans un but de préservation, comme moyen thérapeutique d'une infection opérée principalement.

Vaccination antituberculeuse. — Les méthodes employées visent surtout la préservation de l'espèce bovine, mais intéressent aussi à un haut degré, parce qu'elles peuvent être la base de la préparation des sérums antituberculeux qu'on cherche à employer en thérapeutique.

(1) MAFFUCCI, *Rivista crit. di clinica medica*, 15 et 22 février 1902.

(2) BAUMGARTEN, Ueber die Wege der tuberkulosen Infection (*Zeitschr. für klin. Med.*, VI, 1883, p. 61). — ID., Ueber experimentelle congenitale T. (*Arb. aus dem Inst. zu Tubingen*, I, 1892).

On peut utiliser comme vaccins des Bacilles vivants plus ou moins virulents, des Bacilles morts, des produits sécrétés par des Bacilles virulents.

Il n'est pas possible d'exposer toutes les méthodes essayées ; il faut faire un choix parmi celles qui paraissent les meilleures.

Lorsqu'on emploie des *Bacilles vivants*, leur inoculation se fait par voie sous-cutanée, par voie veineuse, par voie digestive, par voie trachéale.

En introduisant ainsi des *Bacilles de la tuberculose* dans un organisme, on se trouve en présence d'une difficulté particulière, la grande résistance de ces microbes aux actions de résorption qui dépendent surtout de la phagocytose, grâce à la présence des matières grasses ou cireuses protectrices. Le *Bacille tuberculeux* ne se résorbe qu'après un long temps, peut rester dans l'organisme, surtout dans les ganglions. Avec des Bacilles vivants, on se trouve en présence d'un gros inconvénient. Le plus souvent ils n'y prolifèrent pas, grâce à la résistance déjà créée par l'influence du microbe insuffisamment virulent pour infecter ; mais ils y conservent leur activité et peuvent devenir infectants si cette résistance vient à diminuer ou à disparaître.

En tout cas, on peut rencontrer dans ces conditions des Bacilles bien virulents pour le cobaye ; il peut même en être éliminé par l'organisme ; Behring lui-même en a constaté dans le lait de vaches vaccinées.

Avec les *Bacilles morts*, les ennuis sont moindres ; ils ne peuvent occasionner qu'une lésion locale de suppuration, le plus ordinairement minime.

Mais le plus grand danger est dans la nécessité de faire une *inoculation d'épreuve* pour juger du degré d'immunité ou, si l'on veut, de résistance produite. Pour cette inoculation, on doit employer un Bacille virulent qui, introduit dans l'organisme, peut n'y être détruit qu'après un long temps et reste alors principalement dans le système ganglionnaire, y conservant son activité, comme le prouve la virulence, souvent grande pour le cobaye, des ganglions des animaux ainsi traités. Il n'est pas possible jusqu'ici de supprimer cette inoculation d'épreuve ou de la remplacer par quelque autre moyen tout à fait inoffensif : c'est la seule indication certaine que l'on possède encore actuellement sur le résultat obtenu, l'épreuve à la tuberculine, comme l'ont démontré surtout Lignières et Vallée, donnant des résultats beaucoup trop irréguliers.

Malgré ces graves objections, plusieurs des méthodes employées présentent un grand intérêt.

Grancher et H. Martin (1) étaient arrivés à obtenir un certain degré d'immunité chez le lapin en lui inoculant par voie intraveineuse des cultures de tuberculose aviaire atténuées par vieillissement, commençant par des cultures très affaiblies et employant successivement des cultures de plus en plus virulentes. Ils obtenaient une survie très prolongée comparativement aux témoins ; c'était une vaccination imparfaite, mais déjà réelle.

Arloing (2) a obtenu des résultats positifs chez le lapin avec son Bacille

(1) Grancher et H. Martin, Tuberculose expérimentale ; sur un mode de traitement et de vaccination (*Sem. méd.*, 1890, n° 37).

(2) Arloing, Production expérimentale de variétés transmissibles de Bacille de la tuberculose et de vaccin antituberculeux (*C. R. de l'Acad. des sc.*, 1906, CXL, p. 1395).

des cultures homogènes, Bacille atténué dont l'activité est encore amoindrie par la culture à 43°-44°, qui ne tuberculise pas cet animal à doses faibles ou moyennes, et paraît disparaître complètement après s'être cantonné peu de temps dans la rate et la moelle osseuse. Lignières (1) aurait réussi chez le veau également avec des cultures homogènes.

Moeller (2) s'est servi comme vaccin d'un Bacille d'origine humaine qu'il avait fait passer par l'organisme de l'orvet où il s'était beaucoup atténué. Par des injections répétées, il a pu immuniser suffisamment le cobaye et le lapin pour les faire résister à l'injection virulente de Bacille humain. Il a même expérimenté sur lui-même, et annoncé des résultats négatifs. Il aurait aussi obtenu une résistance assez marquée aux inoculations virulentes en vaccinant ses animaux avec des doses graduellement croissantes de divers Bacilles acido-résistants, les Bacilles des herbes (*Timotheebacillus*, *Grasbacillus*), ceux du smegma, du lait et des selles.

Méthode de Behring. — Behring (3) emploie comme vaccin pour ses bovidés un Bacille tuberculeux d'origine humaine entretenu par cultures simples dans son laboratoire depuis des années et ayant perdu toute virulence pour les bovidés et presque toute virulence pour le cobaye chez lequel il produit à peine une petite lésion locale guérissant vite.

La préparation de son vaccin, le *Bovovaccin*, se fait de la façon suivante : On prend une culture en bouillon glycériné âgée de quatre à six semaines : on filtre pour séparer les Bacilles qui sont desséchés dans le vide en présence d'acide sulfurique, puis réduits en poudre.

On les utilise, mis en suspension par broyage dans un mortier, dans de l'eau stérilisée, en injection intraveineuse.

On considère comme unité d'immunisation la dose de 4 milligrammes de ces Bacilles secs, correspondant à environ 20 milligrammes de Bacilles frais ; c'est la dose admise pour une première injection au veau. On fait au même animal une seconde injection de 5 unités, donc 20 milligrammes, trois mois après la première.

La résistance, ou l'immunité relative, obtenue à la suite d'une telle vaccination est réelle, mais paraît d'abord variable, puis plus ou moins durable suivant certains observateurs (4). Elle peut persister pendant une année ou plus, ou durer seulement quelques mois. Elle semble très marquée à l'égard d'une contamination naturelle, telle que peut être celle qui provient d'une cohabitation avec des animaux atteints de tuberculose ouverte ; moins à l'égard des épreuves faites avec des cultures très virulentes. Encore, dans ce dernier cas, les lésions obtenues sont-elles souvent discrètes et peu importantes, à côté des lésions massives obtenues chez les animaux témoins n'ayant pas été vaccinés.

(1) Lignières, Sur la vaccination antituberculeuse des bovidés (*Congr. intern. de la T.*, Paris, 1905, I, p. 229).

(2) Moeller, Ueber aktive Immunisierung gegen Tuberkulose (*Zeitschr. für Tuberkulose*, V, 1905).

(3) Behring, Tuberkulosebekämpfung (*Berl. klin. Wochenschr.*, 1903, n° 11). — La thérapie immunisante à Marbourg contre la tuberculose (*Tuberculosis*, n° 8, 1906).

(4) Rossignol et Vallée, Expériences sur la vaccination antituberculeuse des bovins (*Bull. de la Soc. de méd. vétér.*, 14 mars 1906, p. 39).

Les résultats obtenus à l'aide de la méthode de Behring ont donc un très grand intérêt.

Entre les mains d'autres expérimentateurs, diverses souches de Bacilles humains, normalement très peu virulents pour les bovidés, ont donné des résultats très semblables.

Méthode de Koch et Schütz. — Koch et Schütz (1) injectent par voie veineuse de petites doses de cultures très peu virulentes de Bacilles bovins. C'est le produit qui a reçu le nom commercial de *Tauruman.* En raison de la plus grande virulence des Bacilles, les dangers de leur conservation et de leur prolifération dans l'organisme sont encore plus grands et trop menaçants.

Méthode de Vallée. — Vallée (2) prend comme vaccin un Bacille qui a été isolé, à l'Institut Pasteur, d'une tuberculose du cheval, Bacille très peu virulent pour le cobaye, avirulent pour les bovidés, se résorbant assez facilement dans l'organisme et ne récupérant aucune virulence dans son passage. Il se sert des Bacilles frais, non desséchés, retirés de cultures de bouillon glycériné âgées de six semaines, émulsionnés au mortier d'agate à raison de 1 milligramme de Bacilles, par centimètre cube de solution physiologique. Les doses employées sont, pour une série d'animaux, de 5 milligrammes de Bacilles et 20 milligrammes quatre-vingt-cinq jours après ; pour une deuxième série, de 4 milligrammes de Bacilles et 40 milligrammes quatre-vingt-dix jours après.

La voie veineuse, la voie sous-cutanée, la voie digestive ont été successivement employées.

Les résultats obtenus par l'inoculation intraveineuse sont tout à fait comparables à ceux que donne la méthode de Behring. On obtient une résistance relative proportionnelle à la quantité des Bacilles inoculés comme vaccin. Toutefois, cette vaccination n'est pas valable contre l'infection par les voies digestives.

L'inoculation sous-cutanée ne confère qu'une résistance faible et peu marquée.

L'inoculation par ingestion donne une résistance très réelle à l'infection par les voies digestives. Elle permettrait, ce que ne donne pas la vaccination intraveineuse, la résorption complète, en sept mois au maximum, de Bacilles bovins très virulents, employés comme épreuve. Elle met complètement à l'abri des contaminations assurées par le contact de bêtes à lésions ouvertes pendant un an environ ; après deux ans, dans de telles conditions, les vaccinés ne montrent que de minimes lésions, alors que les témoins ont tous des lésions massives.

Méthode de Calmette et Guérin. — D'après Calmette et Guérin (3), l'ingestion de petites doses de Bacilles bovins virulents, déjà conseillée par Arloing (4), produit chez les bovidés une immunité à l'égard des inoculations virulentes suffisantes pour causer chez les témoins une

(1) Koch, Schütz, Neufeld et Miessner, Ueber die Immunisierung von Rindern gegen Tuberkulose (*Zeitschr. für Hygiene*, LI, 1905, p. 300).

(2) Vallée, Recherches sur l'immunisation antituberculeuse (*Ann. de l'Inst. Pasteur*, XXIII, 1909, p. 585).

(3) Calmette et Guérin, Contribution à l'étude de la vaccination des bovidés contre la tuberculose (*Ann. de l'Inst. Pasteur*, XXI, 1907, p. 525, et XXII, 1908, p. 689).

(4) Arloing, Sur l'indication de la voie digestive pour la vaccination antituberculeuse des jeunes ruminants (*C. R. de l'Acad. des sc.*, 1906, CXLII, p. 1487).

tuberculose rapidement mortelle, les vaccine, par conséquent, pour un certain temps au moins.

Il est toutefois nécessaire, pour réussir, de prendre quelques précautions. Les Bacilles doivent être introduits à l'état d'émulsion très fine obtenue par trituration au mortier d'agate; l'émulsion doit être lentement versée dans l'œsophage à l'aide d'une sonde flexible.

La dose à employer est pour le veau de 5 centigrammes, pour l'adulte de 25 centigrammes de Bacilles frais recueillis directement dans des cultures récentes sur pommes de terre glycérinées.

Il ne faut qu'une seule ingestion. Elle détermine certainement chez l'animal une poussée tuberculeuse, soit pulmonaire, soit plus souvent ganglionnaire. L'animal, en effet, réagit nettement à la tuberculine pendant un à deux mois, puis cesse complètement de réagir. Il est guéri et, en plus, vacciné, comme le prouve sa résistance à l'inoculation virulente faite par voie intraveineuse ou par ingestion. Une dose de 5 milligrammes de Bacilles bovins virulents, introduits par voie intraveineuse à une vache, détermine chez elle une tuberculose suraiguë mortelle en quatre à six semaines.

Ces petites doses de Bacilles finissent par se résorber au bout de quelques mois dans les ganglions mésentériques, comme le démontre l'innocuité de l'inoculation au cobaye.

Si, au contraire, on administre à l'animal plusieurs doses successives, à courts intervalles, il présente rapidement des lésions graves, qui ne guérissent jamais.

Les Bacilles de l'inoculation d'épreuve, introduits par voie digestive, seraient entièrement détruits de quatre à six mois; déjà après le troisième mois il n'en reste que quelques-uns dans les ganglions mésentériques.

Au contraire, en faisant l'inoculation d'épreuve par la voie intraveineuse, il en subsiste de virulents très longtemps après, sans toutefois que l'animal ait, dans cet intervalle, réagi à la tuberculine.

L'immunité ainsi obtenue est une immunité relative qui peut durer au moins une année environ, permettant aux animaux de résister aux infections artificielles par voie digestive ou à l'infection naturelle par cohabitation avec des animaux en état de tuberculose ouverte. Si l'infection d'épreuve est faite par voie intraveineuse, les Bacilles persistant dans les ganglions peuvent, au moment où la résistance s'affaiblit suffisamment ou disparaît, entre douze à dix-huit mois par exemple, devenir infectants et déterminer des lésions tuberculeuses.

D'après Vallée, la vaccination par voie digestive avec des Bacilles bien virulents réussirait bien chez les jeunes sujets, les veaux, et mal, par contre, chez les adultes. On n'obtiendrait en plus qu'une vaccination relative; certains vaccinés, exposés à la contagion par cohabitation, montrent quelquefois des lésions tuberculeuses, qui à la vérité sont minimes, insignifiantes lorsqu'on les compare aux lésions de témoins.

Calmette et Guérin ont obtenu les mêmes conditions de résistance par l'ingestion, répétée deux fois à quarante-cinq jours d'intervalle, des mêmes Bacilles chauffés préalablement à 70° pendant cinq minutes, température insuffisante pour les tuer.

Les procédés de vaccination à l'aide de *Bacilles morts*, s'ils permettaient de conférer aux animaux une résistance semblable à celle obtenue par les méthodes précédentes et si l'on pouvait également se passer de l'ino-

culation d'épreuve aux Bacilles virulents, auraient sur elles un immense avantage, celle d'une sécurité absolue à l'égard des dangers que peut occasionner la persistance possible de Bacilles vivants et virulents dans l'organisme. Les Bacilles morts, en effet, si leur résorption ne se fait pas dans le temps voulu, ne peuvent occasionner que des lésions locales chez le vacciné et, de plus, ne sont d'aucun danger pour l'entourage. C'est là un point d'une très grande importance. Malheureusement, chez les bovidés, les résultats obtenus jusqu'ici semblent nettement inférieurs à ceux que fournit l'emploi de Bacilles vivants. Mais on ne peut que fortement encourager les chercheurs dans cette direction.

Calmette et Guérin (1) rapportent un fait de vaccination d'une vache à l'aide de Bacilles bovins préalablement chauffés pendant cinq minutes à 100°. L'animal avait reçu, par ingestion, une première fois 10 centigrammes de Bacilles et une seconde fois, quarante-huit jours après, 50 centigrammes. Il a résisté à une ingestion d'épreuve de 25 centigrammes de Bacilles virulents et paraissait indemne après deux ans.

Vallée (2) n'aurait observé aucun effet, chez la vache et le veau, avec des Bacilles bovins chauffés à 100° pendant une minute.

Avec des Bacilles tués par l'iode, les hypochlorites, l'alcool, les résultats ont aussi été nuls. Les Bacilles dégraissés par le toluène ou l'éther de pétrole lui ont paru avoir une certaine action ; à la suite des inoculations d'épreuve, intraveineuses ou par ingestion, les lésions n'ont été, dans plusieurs cas, que très limitées.

Moussu et Goupil (3) disent avoir obtenu un certain degré de résistance chez le chien et le lapin avec des Bacilles traités par le chlore. Une émulsion bacillaire est agitée pendant quelques heures avec de l'eau chlorée. Les Bacilles perdent leur acido-résistance et deviennent vite granuleux. Ils conservent un pouvoir toxique assez marqué.

Rappin (4) obtiendrait une immunisation marquée à l'aide de Bacilles tuberculeux sur lesquels il fait agir des solutions convenablement titrées de fluorure de sodium, sans autre modification ou après les avoir dégraissés. L'injection intraveineuse de ces Bacilles modifiés, faite pendant plusieurs mois à des doses variables, a semblé conférer à des jeunes bovins, génisses et taureaux, une véritable immunisation. Ces recherches ont cependant besoin d'être étendues.

L'emploi des *produits solubles* pour la vaccination, s'il arrivait à donner des résultats satisfaisants, aurait d'abord sur l'utilisation des Bacilles vivants les mêmes avantages que les Bacilles morts ; puis, en plus, mettrait à l'abri des accidents locaux qui peuvent être occasionnés par ces derniers.

Seulement, on se heurte ici à la grande difficulté, voire même l'impossibilité de la diffusion de certains des principes actifs du Bacille tuberculeux, très adhérents aux corps microbiens. Les produits qui diffusent dans les milieux ne représentent qu'une partie des principes actifs du

(1) Calmette et Guérin, *Ann. de l'Inst. Pasteur*, 1907, p. 529.

(2) Vallée, *Loc. cit.*, p. 710 et 729.

(3) Moussu et Goupil, Action du chlore sur le Bacille tuberculeux (*C. R. de l'Acad. des sc.*, 1908, CXLV, p. 1231). — Propriétés physiologiques des Bacilles tuberculeux chlorés (*Ibid.*, p. 1359).

(4) Rappin, Vaccination antituberculeuse des bovidés (*C. R. de l'Acad. des sc.*, 9 août 1909). — La vaccination antituberculeuse (*Arch. intern. de pharmacodynamie*, 1906-1907, 1909).

microbe, et peut-être les moins importants pour les actions que l'on recherche.

Dès le début de la tuberculine, Koch a cherché à l'utiliser pour obtenir une immunisation à l'égard du microbe. Sa constitution, trop incomplète, ne pouvait permettre d'obtenir des résultats bien appréciables. Des substances actives, autres que celles qu'elle renferme, doivent entrer en jeu. Aujourd'hui même, que l'on connaît mieux la complexité de ces dernières, il ne semble guère que la question ait avancé.

Un très grand nombre de recherches ont été faites, avec des produits très variés, filtrats de cultures en divers milieux, produits extraits des corps microbiens par des dissolvants divers, produits retirés de tissus tuberculeux, etc. On ne voit encore pas d'indications nettement utilisables.

Heymans (1) a essayé d'immuniser les bovidés en leur insérant sous la peau des sacs collodionnés (p. 356) contenant du bouillon de culture chargé de Bacilles virulents. Il se produit une lente diffusion de produits microbiens qui agissent sur l'organisme et le sensibilisent d'une façon spéciale, puisque, dans un délai de quinze à quarante jours, il réagit à la tuberculine. Cette sensibilité à la tuberculine disparaît de six à huit mois après l'inoculation. L'immunisation est alors produite ; les animaux résistent entièrement aux inoculations virulentes d'épreuve, ou au moins ne présentent à leur suite que des lésions minimes.

Moussu (2) dit n'avoir rien obtenu d'efficace par un procédé analogue, en laissant séjourner dans le péritoine, pendant de longs mois, de petites bougies filtrantes contenant du bouillon largement ensemencé de Bacilles virulents. Les lésions observées sur de tels animaux, après l'épreuve, seraient peut-être un peu moins étendues que chez les témoins, mais toujours très notables cependant.

Sérothérapie antituberculeuse. — Beaucoup de ces recherches ont eu surtout pour but l'obtention d'un sérum actif contre la tuberculose.

Les premières recherches de *sérothérapie antituberculeuse* sont dues à Héricourt et Richet (3), qui avaient observé une survie bien nette à l'inoculation tuberculeuse chez des cobayes auxquels ils injectaient, au préalable, du sérum d'un animal peu sensible à la tuberculose, l'âne ou le chien. Le sérum de tels animaux est malheureusement très peu actif ; la quantité de produits antitoxiques qu'il contient est, en général, insuffisante pour produire des effets curatifs ou préventifs sérieux à dose ordinaire, quoique suffisante en sa totalité pour conférer à l'animal l'état réfractaire complet ou imparfait, suivant les circonstances. Les mêmes expérimentateurs ont, plus tard, cherché à obtenir un sérum plus actif en inoculant leurs animaux avec des produits virulents ou des produits solubles. Il est certain que les résultats qu'ils ont obtenus

(1) Heymans, Sur la vaccination antituberculeuse des bovidés (*Acad. de méd. de Belgique*, 29 janvier 1910).

(2) Moussu, Culture de tuberculose *in vivo* et vaccination antituberculeuse (*C. R. de l'Acad. des sc.*, 1907, CXXXV).

(3) Héricourt et Richet, De l'immunité conférée à des lapins par la transfusion péritonéale du sang de chien (*Études expérim. et clin. sur la T. publiées par Verneuil*, II, 1890, p. 381 et 678). — Id., Transfusion du sang de chien pour obtenir l'immunité contre la T. (*Ibid.*, III, 1892, p. 139). — De la vaccination contre la T. (*Ibid.*, III, 1892, p. 124 et 365).

chez l'homme ou l'animal, quoique incomplets, sont à considérer.

Depuis cette époque, et surtout à la suite des découvertes de Behring sur les sérums antitoxiques, il s'est fait de très nombreuses recherches pour obtenir un sérum réellement actif contre la tuberculose, en faisant intervenir alors ou des produits solubles de cultures ou des dérivés des corps microbiens.

On a d'abord essayé, par analogie, la tuberculine, ou les simples filtrats de culture. Les résultats ont été peu heureux, pour la raison que ces produits ne renferment qu'une partie, une certaine catégorie des principes actifs; tout ce qui reste dans le corps des microbes, et c'est la partie la plus intéressante, toxines sclérosantes ou caséifiantes, bacillo-caséine, etc. (p. 709), n'intervient pas. Ce que l'on peut obtenir, c'est un *sérum antituberculineux*. Aussi s'est-on trouvé dans l'obligation de faire plus. Le principe qui sert de guide est que les divers produits tuberculeux, introduits comme antigènes dans l'organisme, doivent déterminer la formation d'anticorps correspondants, jouissant, lorsqu'ils sont introduits dans d'autres organismes atteints par le microbe, de propriétés antagonistes, conséquemment curatives, à l'égard de ce dernier ou des effets qu'il occasionne.

Or, il faut reconnaître que la connaissance des anticorps tuberculeux est encore bien peu avancée. Beaucoup en nient même la formation. Il semble qu'il en existe de véritables, mais de simples anticorps partiels, répondant à l'action de certains des principes toxiques du microbe, ceux relatifs à la tuberculine surtout, *anticorps tuberculineux*, ou à certaines actions un peu spéciales, agglutinines, précipitines, bactériolysines par exemple; mais pas d'antitoxines à effets généraux, parce que peut-être on n'est pas arrivé à mettre en action la totalité des principes actifs. Ces anticorps, actuellement obtenus, peuvent agir contre une catégorie de phénomènes de l'infection ; ils ne semblent pas agir bien efficacement contre le syndrome.

D'où l'activité relativement peu grande des *sérums antituberculeux* obtenus. De plus, tous ces sérums semblent occasionner plus facilement que d'autres des accidents d'anaphylaxie (1); c'est encore un obstacle à leur emploi. Il paraît difficile, dans l'état actuel, d'émettre un jugement bien assis sur leur efficacité.

Sérum de Maragliano. — Maragliano (2) obtient son sérum en injectant à des animaux divers, chevaux, ânes, vache, chèvre, un mélange de filtrats de cultures, en bouillon glycériné, de Bacilles humains très virulents et d'extrait aqueux des corps bacillaires.

Divers modes de préparation ont été donnés.

Le mélange serait actuellement préparé de la façon suivante : une culture, âgée de six semaines, est filtrée sur papier Chardin. On obtient un filtrat. Les Bacilles restés sur le filtre sont lavés, puis longuement broyés dans un mortier avec une petite quantité de solution alcaline de carbonate de soude à 2 p. 100; le liquide est filtré sur papier et le résidu est à nouveau traité de la même façon ; ces liquides sont réunis, filtrat 2. On réunit les filtrats 1 et 2 et on passe le tout à la bougie Chamberland.

(1) Guinard, *Revue de la tuberculose*, 2e série, t. IV.

(2) Maragliano, Le sérum antituberculeux et son antitoxine (*Presse méd.*, 1896, p. 273). — Id., Thérapeutique spécifique de la tuberculose (*Assoc. franç. pour l'avanc. des sciences*. Congrès de Lyon, 1906).

On ajoute au produit obtenu parties égales d'un autre liquide qui serait un véritable suc bacillaire, obtenu en faisant macérer dans une solution de chlorure de sodium, pendant quinze jours, des Bacilles âgés et virulents, puis passant à la bougie Chamberland. Le mélange est alors concentré à froid jusqu'à ce qu'il montre un certain degré de toxicité, qui est l'unité toxique : une dose d'un centimètre cube par 100 grammes doit tuer en trois jours au maximum un cobaye normal.

L'inoculation aux animaux doit être faite graduellement et avec prudence ; les injections sont espacées suivant la tolérance. Le sérum serait utilisable après quatre à cinq mois.

Le sérum sanguin, les globules blancs, le suc des tissus, le lait contiendraient les principes antitoxiques, bactériolysines, agglutinines et antitoxines.

L'unité antitoxique, d'après Maragliano, est la quantité d'antitoxine qui dans 1 centimètre cube de sérum protège 1 gramme de cobaye. Un sérum qui, à la dose de 1 centimètre cube, protège 100 grammes de cobaye, renferme 100 unités antitoxiques. On arriverait facilement à obtenir 1000 unités antitoxiques par centimètre cube.

L'emploi thérapeutique d'un tel sérum aurait donné des résultats très favorables à Maragliano et à ses élèves ; des résultats nuls ou négligeables à d'autres.

Sérum de Marmorek. — Marmorek (1) immunise des chevaux en se servant d'un produit toxique spécial qu'il obtient en cultivant le Bacille dans un mélange d'un sérum leucotoxique et de bouillon à la macération de foie. Le *sérum leucotoxique* est obtenu chez le veau auquel on a injecté des solutions chargées de leucocytes de cobayes, obtenus par lavage à la solution physiologique de la cavité péritonéale de cobayes auxquels on a injecté dans le péritoine, quarante-huit heures avant, du bouillon peptonisé. La macération de foie, d'après Marmorek, aurait une action antagoniste sur les Bacilles. Dans le mélange, les Bacilles se développent mal et conserveraient longtemps leur caractère jeune, de Bacilles primitifs, à membrane peu imprégnée de matières cireuses et conséquemment plus perméable. Dans ces conditions, ils laissent diffuser leur vraie toxine ; les produits qui constituent la tuberculine n'apparaissent que tardivement et seulement en petite quantité. Après filtration sur bougie, on obtient un liquide toxique qui, à la dose de 25 à 30 centimètres cubes, par injections de 4 ou 5 centimètres cubes, immuniserait le cobaye.

C'est ce liquide qui est inoculé à des chevaux à plusieurs reprises. Après un certain temps, leur sérum se montrerait doué de propriétés préventives et curatives à l'égard de l'infection tuberculeuse.

Plus tard, Marmorek a modifié son sérum en faisant intervenir, dans l'immunisation, de la toxine streptococcique obtenue d'un Streptocoque isolé de crachats de phtisiques. Un tel sérum peut agir contre l'infection mixte si fréquente. Il a enfin cherché à ajouter un pouvoir antibactérien au pouvoir antitoxique, et pour cela a inoculé en plus aux chevaux des corps bacillaires morts.

(1) Marmorek, Sérum et vaccin antituberculeux (*Arch. gén. de méd.*, 24 novembre 1903). — Antituberkulos-Serum und Vaccin (*Berl. klin. Wochenschr.*, 30 novembre 1903, p. 1108). — Le sérum antituberculeux, ses effets et son application (*XIe Congrès français de médecine*, Paris, octobre 1910).

Le sérum peut être donné en injection sous-cutanée, à la dose de 10 à 20 centimètres cubes tous les huit jours, mais les accidents d'anaphylaxie sont fréquents ; ou par voie rectale, en lavements, 10 centimètres cubes tous les deux jours, avec repos de dix ou quinze jours après chaque série de dix opérations. L'absorption par voie rectale est réelle, mais moins importante et moins rapide ; elle ne donne jamais d'accidents.

Il est difficile de se faire une opinion nette sur les résultats obtenus avec le sérum de Marmorek, très prôné par certains, dénué de toute activité suivant d'autres.

Sérum de Lannelongue, Achard et Gaillard (1). — Il est obtenu à la suite d'injections à l'âne et au cheval d'une toxine produite en traitant les Bacilles par l'eau à 120°, précipitant par l'acide acétique et redissolvant dans de l'eau additionnée de carbonate de soude. L'emploi du sérum chez les tuberculeux favoriserait la régression des lésions.

Sérum de Vallée. — Vallée (2) immunise d'abord des chevaux en leur inoculant, en injection intraveineuse, du Bacille équin dont il a été parlé plus haut (p. 729), par intervalles de trois à six mois, à des doses de 5, 10, 50, 200 et 350 milligrammes. Après cette préparation, il leur injecte 15, 25, jusque 100 milligrammes d'un Bacille humain de virulence moyenne pour le cobaye. Au cours de ce traitement, les animaux restent sensibles à la tuberculine.

Chez les chevaux ainsi traités, il n'est possible de trouver aucune trace de lésion tuberculeuse à l'autopsie ; les cobayes inoculés avec de la pulpe de leurs ganglions restent tous indemnes. La résorption des Bacilles introduits a donc été complète.

Ce sérum n'est pas doué de propriétés agglutinantes bien nettes ; mais, par contre, il est riche en sensibilisatrice, comme le montre la réaction de Bordet et Gengou opérée avec du sérum de cobaye. Il a donné chez les animaux des résultats intéressants et serait à l'étude chez l'homme. Pour parer aux accidents d'anaphylaxie, on le soumet à deux chauffages successifs à 50° pendant quelques minutes.

HABITAT ET RÔLE ÉTIOLOGIQUE

Le *Bacille de la tuberculose* doit être très répandu dans la nature. L'expectoration des phtisiques, en particulier, en répand un nombre considérable dans le milieu extérieur ; les autres produits tuberculeux, le pus tuberculeux, les cadavres d'hommes ou d'animaux tuberculeux, en augmentent encore le nombre. Ces produits se dessèchent ; les microbes qu'ils contiennent se mêlent aux poussières et peuvent être mis en suspension dans l'air. Ceux qui sont dans les couches profondes du sol peuvent être ramenés à la surface par des manipulations du sol ou par des êtres qui vivent dans ces couches profondes, vers de terre (3) ou autres animaux. Ces Bacilles ne se multiplient guère dans le milieu

(1) Lannelongue, Achard et Gaillard, Application à l'homme d'un sérum antituberculeux (*C. R. de la Soc. de Biol.*, 1907).

(2) Vallée, Recherches sur l'immunisation antituberculeuse. 2e mémoire (*Ann. de l'Inst. Pasteur*, XXIII, 1909, p. 665).

(3) Lortet et Despeignes, Vers de terre et Bacille tuberculeux (*Lyon méd.*, 1892, p. 157).

extérieur, à cause de leurs exigences spéciales, particulièrement le besoin d'une température assez élevée ; mais ils peuvent y conserver longtemps leur virulence.

Les selles des tuberculeux renferment aussi d'ordinaire de nombreux Bacilles de Koch, provenant de l'ingestion des crachats ou, plus rarement, de lésions intestinales (1).

Le *Bacille tuberculeux* passe fréquemment dans l'urine, même en dehors de toute lésion spécifique du rein ; on l'y retrouverait, en usant de la centrifugation, dans tous les cas de tuberculose à évolution rapide, ce qui pourrait permettre d'établir le diagnostic de certaines formes de granulie (2).

L'air expiré par les phtisiques s'est toujours montré indemne.

Les tentatives faites pour déceler directement la présence du *Bacille de la tuberculose* dans l'air ont échoué jusqu'ici. Il existe cependant des faits expérimentaux certains qui permettent de se faire une opinion. Cadéac et Malet (3) ont observé la tuberculose chez des cobayes auxquels ils avaient injecté dans le péritoine de l'eau de condensation de l'air d'une salle de phtisiques. Cornet (4) a obtenu de nombreux résultats positifs en inoculant à des cobayes par la même méthode des poussières recueillies dans les salles de phtisiques ou dans des appartements occupés par des tuberculeux. Straus (5) a démontré la présence de *Bacilles tuberculeux* virulents à l'intérieur de la cavité nasale d'individus sains fréquentant les milieux habités par des phtisiques ; la moitié des sujets fréquentant le milieu hospitalier, indemnes de tout soupçon de tuberculose, hébergeaient le *Bacille de la tuberculose* virulent dans leurs cavités nasales.

Jessen et L. Rabinowitch (6) ont pu retrouver du *Bacille tuberculeux* virulent dans l'eau de la rivière qui coule à Davos, au point où débouche l'égout collecteur de la ville et jusqu'à 100 mètres au-dessous de ce déversoir ; plus loin, il n'a plus été possible d'en constater la présence, l'oxydation, l'agitation du courant, ayant probablement amené leur destruction. Toujours est-il qu'ils peuvent subsister pendant quelque temps dans l'eau avec leur virulence.

Les Bacilles peuvent être disséminés en outre par d'autres moyens de transport. C'est ainsi que Spillmann et Haushalter (7) ont démontré que les mouches, qui s'abattent en essaim sur les crachoirs des salles d'hôpital en été, emportent de nombreux *Bacilles tuberculeux*, soit accolés à leurs téguments, soit introduits dans leur intestin, qu'ils traversent sans subir d'altération.

L'étiologie de la tuberculose est aujourd'hui facile à établir. L'infec-

(1) Anglade et Chocreaux, Le pouvoir tuberculisant des selles des tuberculeux ; sa résistance à l'action du froid, de la dessiccation (*Soc. de Biol.*, 19 avril 1902).

(2) Fournier et Beaufumé, Recherche du Bacille de Koch dans l'urine (*Soc. de Biol.*, 15 novembre 1902).

(3) Cadéac et Malet, De la transmission de la T. par l'air expiré et par l'atmosphère (*Revue de méd.*, 1887, p. 545).

(4) Cornet, Die Verbreitung der Tuberkelbacillen ausserhalb des Korpers (*Zeitschr. für Hygiene*, V, 1888, p. 191).

(5) Straus, Sur la présence du Bacille de la T. dans les cavités nasales de l'homme sain (*Acad. de méd.*, 3 juillet 1894. — *Arch. de méd. expér.*, 1894, p. 633).

(6) Jessen et L. Rabinowitch, *Berlin. klin. Wochenschr.*, 9 mai 1910.

(7) Spillmann et Haushalter, Dissémination du Bacille de la T. par les mouches (*C. R. de l'Acad. des sc.*, 16 août 1887).

tion se fait par pénétration de Bactéries spéciales dans l'organisme; chez l'homme, elle doit toutefois ne se produire que chez des individus présentant une prédisposition particulière, héréditaire ou acquise. Les voies d'infection sont diverses et le mode de développement de la maladie semble être en rapport direct avec le lieu d'entrée du virus, les lésions primitives, parfois uniques, se trouvant dans le voisinage immédiat. La contamination paraît se faire le plus souvent par la voie pulmonaire ou le tube digestif; elle peut se faire aussi, mais exceptionnellement, il semble, par la peau ou les muqueuses et par transmission héréditaire.

Contamination par le poumon. — La très grande fréquence de la tuberculose pulmonaire chez l'homme a certainement été la raison pour laquelle on a mis longtemps au tout premier rang la contamination par la voie respiratoire. La clinique indiquait que souvent les lésions pulmonaires étaient nettement secondaires, mais ce n'est que plus tard, à la suite d'expérimentation, qu'on a pu se rendre compte que les lésions pulmonaires pouvaient fort bien ne pas être des lésions primitives, issues d'une infection réalisée sur place, mais des lésions de généralisation ou tout au moins d'extension d'une infection qui pouvait fort bien s'être produite ailleurs, au loin même, l'état de *locus minoris resistantiæ* du poumon à l'égard de la tuberculose intervenant pour attirer les lésions sur lui.

La production de la tuberculose par inhalation de produits virulents est un fait démontré. Villemin (1) déjà avait vu qu'on rendait le lapin tuberculeux en insufflant dans sa trachée des crachats tuberculeux fraîchement desséchés et pulvérisés. Les recherches précitées (p. 736) de Cadéac et Malet, de Cornet le prouvent aussi. Mais il faut bien reconnaître que la réussite n'est pas constante, varie au contraire avec la façon de procéder.

Il ressort nettement d'expériences de Cadéac et Malet (2) que l'état dans lequel se trouve la matière virulente lors de son entrée dans l'appareil respiratoire influe considérablement sur les résultats. Tandis que l'inhalation de poussières sèches renfermant des *Bacilles tuberculeux* ne donne que rarement la tuberculose au cobaye, la pénétration dans les voies respiratoires de ces mêmes Bactéries mélangées à des liquides, soit par pulvérisation, soit par introduction directe, rend constamment phtisiques les animaux sur lesquels on expérimente. On sait que tous les germes contenus dans l'air inspiré se fixent dans les bronches ou les poumons : l'air expiré est toujours complètement dépourvu de germes. Cadéac et Malet (3), Straus (4), l'ont montré pour diverses maladies contagieuses, en particulier la tuberculose. Flügge et ses élèves (5) incriminent surtout, et avec raison

(1) Villemin, De la propagation de la phtisie (*Gazette hebdomadaire*, 1869, p. 260).

(2) Cadéac et Malet, Recherches expérimentales sur la transmission de la T. par les voies respiratoires (*C. R. de l'Acad. des sc.*, 12 décembre 1887).

(3) Cadéac et Malet, *Revue de méd.*, 1887.

(4) Straus, Sur l'absence de microbes dans l'air expiré (*C. R. de l'Acad. des sc.*, 5 décembre 1887).

(5) Flügge, Die Verbreitung der Phtisie durch staubförmiges Sputum und durch beim Husten verspritzte Tröpfchere (*Zeitschr. für Hygiene*, XXX, 1899, p. 107). — Weitere Beiträge zur Verbreitungsweise und Bekämpfung der Phtisie (*Ibid.*, XXXVIII, 1901, p. 1).

semble-t-il, les fines gouttelettes de salive ou de crachats projetées par la toux ou même par la parole, pouvant transporter des microbes assez loin du porteur, à plusieurs mètres même parfois; ce serait là, pour eux, les conditions les plus favorables pour la dissémination d'un contage actif.

Il faut cependant que les fines particules liquides qui véhiculent les microbes pénètrent assez loin dans le poumon. En somme, d'après les expériences faites, la contagion par voie pulmonaire semble être beaucoup moins commune qu'on l'a pensé. Les poussières sèches employées dans les meilleures conditions, très fraîchement préparées, ne la déterminent que rarement; celles qui ont subi une dessiccation un peu prolongée, comme cela se voit souvent dans la nature, ne sont plus virulentes ou suffisamment virulentes; d'un autre côté, la production et l'inhalation de poussières liquides est un fait plutôt rare, à part dans les conditions envisagées par Flügge. Il faut aussi songer que ces poussières peuvent se déposer dans les voies respiratoires antérieures, être dégluties et agir dès lors par ingestion.

Contamination par l'intestin. — La contamination par voie intestinale a été démontrée dès 1868 par Chauveau (1) qui affirmait déjà sa prédominance sur la voie pulmonaire. Depuis, de nombreuses expériences ont confirmé ses résultats. Dobroklowsky (2) a montré que le *Bacille tuberculeux* passait facilement à travers la muqueuse intestinale saine; Nicolas et Descas (3) ont vu que, chez le chien, trois heures après l'ingestion de Bacilles tuberculeux, on pouvait déjà en retrouver dans le chyle et la lymphe du canal thoracique, même sur des préparations colorées, surtout par l'inoculation au cobaye. Il est bien démontré que la muqueuse intestinale se laisse facilement traverser par des particules de petit volume, noir de fumée, carmin par exemple; il en est certainement de même pour les microbes. En tout cas, la pénétration peut s'effectuer sans lésions appréciables de la muqueuse. Behring (4), en 1903, a émis l'opinion que la tuberculose pulmonaire n'était pas d'origine respiratoire, mais provenait plutôt d'une infection par ingestion. Des expériences de Calmette et Guérin (5), de Vallée (6) sont venues appuyer cette opinion et démontrer d'une façon absolue la réalité et l'importance de la voie intestinale dans l'infection tuberculeuse chez les bovidés et les ovidés. La facilité d'infection est même très grande, pourvu que certaines conditions soient observées dans l'ingestion, surtout une émulsion fine des Bacilles dans le produit ingéré, comme le démontrent Calmette et Guérin, les Bacilles ingérés en amas ne déterminant qu'exceptionnellement l'infection. Ces derniers expérimentateurs ont reconnu la sensibilité plus grande des adultes à

(1) Chauveau, T. expérimentalement produite par l'ingestion de matière tuberculeuse (*Gaz. méd. de Lyon*, 1868).

(2) Dobroklowsky, De la pénétration des Bacilles tuberculeux dans l'organisme à travers la muqueuse intestinale (*Arch. de méd. expér.*, II, 1890, p. 253).

(3) Nicolas et Descas, Passage des Bacilles tuberculeux, après ingestion, de l'intestin dans les chylifères et le canal thoracique (*Soc. de Biol.*, 19 juillet 1902).

(4) Behring, Tuberkulosebekämpfung (*75e Vers. deutscher Naturforsch. und Aertze in Cassel*, 25 septembre 1903).

(5) Calmette et Guérin, Origine intestinale de la tuberculose pulmonaire (*Ann. de l'Inst. Pasteur*, 1905, XIX, p. 601; 1906, XX, p. 153 et 609).

(6) Vallée, De la genèse des lésions pulmonaires dans la tuberculose (*Ann. de l'Inst. Pasteur*, 1905, XIX, p. 619).

l'ingestion de produits virulents, les Bacilles étant, chez les jeunes, à défense lymphatique très active, ordinairement retenus dans les ganglions mésentériques, tandis que chez les adultes ils sont plus facilement entraînés par les leucocytes qui les emportent dans la circulation lymphatique et, par l'artère pulmonaire, dans le poumon.

Ces faits ont une portée hygiénique considérable. Ils démontrent, en effet, que l'alimentation peut jouer un rôle dans la transmission de la phtisie. Or, un grand nombre de produits d'alimentation, provenant d'animaux tuberculeux, peuvent contenir le *Bacille de la tuberculose*. C'est au premier rang les viscères, foie, rate, poumons surtout, ganglions aussi ; puis, lorsque la tuberculose se généralise, des produits de sécrétion, le lait surtout, les muscles également. Les viandes tuberculeuses peuvent conserver leur puissance virulente, même après une cuisson modérée, comme l'ont démontré les expériences précédemment citées de Galtier, même après la salaison ou la fumure, lorsque ces procédés ne sont pas appliqués à fond. La tuberculose y est la plupart du temps difficile à reconnaître, à cause de la dissémination et du peu d'étendue des lésions et de l'enlèvement, opéré d'avance, de tout ce qui peut attirer l'œil de l'inspecteur, qui ne peut se prononcer en toute assurance lorsqu'il n'a pas à sa disposition les organes où les localisations se montrent avec évidence.

Le lait peut renfermer des *Bacilles tuberculeux*, comme le prouvent de nombreux résultats positifs obtenus à la suite d'injections intrapéritonéales aux cobayes de laits provenant de vaches tuberculeuses (1).

D'après L. Rabinowitch, la proportion des laits bacillifères serait de 28 p. 100 à Berlin ; elle serait de 22 p. 100 à Londres, d'après Macfadyen ; de 16 p. 100 à New-York, d'après Hess (2).

On doit probablement rapporter au lait tuberculeux certaines des tuberculoses des enfants du premier âge. Plus tard, sa virulence serait bien moins à craindre. En tout cas, le danger paraît être bien moindre qu'on se l'imaginait il y a quelque temps.

Le *Bacille tuberculeux* peut également se rencontrer dans les produits dérivés du lait, le beurre principalement. Sa présence se recherche par l'inoculation dans le péritoine de cobayes de quelques centimètres cubes, 4 à 5, par exemple, du beurre maintenu fondu à 37°. Alors que les recherches de Rabinowitch (3) la font regarder dans ces conditions comme presque exceptionnelle, celles de Petri (4), de Hormann et Morgenroth (5), d'Obermuller (6) la donnent comme assez fréquente. Il est nécessaire de bien faire ici la distinction entre un *Bacille pseudo-tuberculeux* se rencontrant très souvent dans le beurre, présentant les mêmes caractères de forme et de coloration que le *Bacille tuberculeux*,

(1) Nocard, Études sur l'inoculation du suc musculaire et du lait non bouilli des vaches tuberculeuses (*Recueil de méd. vétér.*, 1885).

(2) Hess, The incidence of Tubercle Bacilli in New York city Milk (*Studies from the Laboratory Research of New York*, IV, 1908-1909).

(3) L. Rabinowitch, Zur Frage des Vorkommens von Tuberkelbacillen in der Marktbutter (*Zeitschr. für Hygiene*, XXVI, 1898, p. 90. — Et : *Deutsche med. Wochenschr.*, janvier 1899, n° 1).

(4) Petri, Zum Nachweiss der Tukerbelbacillen in Butter und Milch (*Arb. aus dem kaiserl. Gesundheitsamte*, XIV, 1898, p. 1).

(5) Hormann et Morgenroth, *Hygienische Rundschau*, 1898, p. 217.

(6) Obermuller, *Hygienische Rundschau*, 1899, n° 2, p. 57.

qu'il est nécessaire de distinguer (Voy. p. 776). Le beurre, se consommant très souvent frais, peut être un excellent véhicule du contage. Morgenroth (1) signale la présence du *Bacille tuberculeux* virulent dans la margarine du commerce.

Le Bacille de Koch se rencontre rarement dans les fromages faits, d'où il disparaîtrait même toujours avant le moment de la consommation. Par contre, il serait fréquent dans les fromages blancs ou les fromages à la crème qui se consomment de suite.

Enfin, beaucoup d'aliments ordinaires peuvent être souillés, après cuisson et avant consommation, par dépôt à leur surface de particules virulentes apportées par l'air, par des contacts ou par des mouches, comme il a été dit plus haut (p. 736).

Contamination par la peau. — La transmission peut se faire par inoculation directe sur la peau ou les muqueuses ; beaucoup de *tubercules anatomiques* reconnaissent cette origine (p. 724). Les expériences de Cornet (2), de Courmont et Lesieur (3), de Babès et Riegler (4), montrent que l'infection tuberculeuse peut se produire, chez le lapin, le cobaye, le veau, en mettant des produits tuberculeux virulents en contact avec la peau préalablement rasée ou épilée. L'opération du rasage ou de l'épilage produit toutefois des lésions, au moins légères, diminuant la protection du tégument.

Contamination héréditaire. — Certains sujets, enfin, semblent naître tuberculeux. Le passage des *Bacilles tuberculeux* dans le placenta et la production de tubercules chez les fœtus de femelles de cobayes tuberculeuses ont été constatés par Koubassoff (5). Par contre, nous avons vu que Sanchez-Toledo (6), en expérimentant sur les mêmes animaux, a constamment obtenu des résultats négatifs ; mais de nombreuses observations cliniques de médecins ou de vétérinaires démontrent nettement l'existence de la *tuberculose congénitale*, qui est nettement prouvée par l'expérimentation (Voy. p. 724).

Toutefois, l'observation conduit à admettre la rareté de la tuberculose congénitale chez les rejetons de tuberculeux, provenant très probablement de ce que le placenta n'est pas souvent atteint dans cette affection et peut alors jouer son rôle de filtre. Mais il est démontré, surtout par des expériences de Charrin (7), que de tels rejetons sont dans un état réel d'infériorité organique et peuvent moins bien se défendre contre les infections et en particulier contre l'infection tuberculeuse qui les menace de tous côtés. Ce que le médecin doit conclure de ceci, c'est qu'il y a surtout nécessité de chercher à soustraire les enfants de parents tuberculeux à tout danger de contamination.

(1) Morgenroth, *Hygienische Rundschau*, IX, 1899, n° 10.

(2) Cornet, Experimentelle Untersuchungen über Tuberkulose (*Intern. klin. Hunds.* 1888, n° 19).

(3) J. Courmont et Lesieur, Passage du Bacille tuberculeux à travers la peau du cobaye, du veau et du lapin (*Soc. de Biol.*, 29 juin 1907).

(4) Babès, Pénétration du Bacille tuberculeux par la peau intacte (*Presse médicale*, 1908, n° 48).

(5) Koubassoff, Passage des microbes pathogènes de la mère au fœtus (*C. R. de l'Acad. des sc.*, 1885).

(6) Sanchez-Toledo, Recherches expérimentales sur la transmission de la T. de la mère au fœtus (*Arch. de méd. expér.*, 1889, p. 503).

(7) Charrin, Modifications constatées dans l'organisme des rejetons des tuberculeux (*Congrès pour l'étude de la T.*, 1898).

Les conditions de réceptivité, peu connues encore, doivent jouer un grand rôle dans la transmission de la maladie, et ceci relève encore certainement de l'hérédité. Il existe des *prédispositions* qui souvent ne se développent qu'accidentellement. Ces prédispositions influent non seulement sur l'évolution générale de l'affection, mais encore sur les localisations qu'elle produit. Il est difficile actuellement d'être très précis à ce sujet. Il est probable qu'il y a là une véritable tare cellulaire qui peut avoir été produite par l'action des produits toxiques, qui fait, en tout cas, que l'organisme se trouve en réel état d'infériorité vitale.

Lésions tuberculeuses. — Les lésions caractéristiques sont les *granulations tuberculeuses*, pouvant se rencontrer dans presque tous les

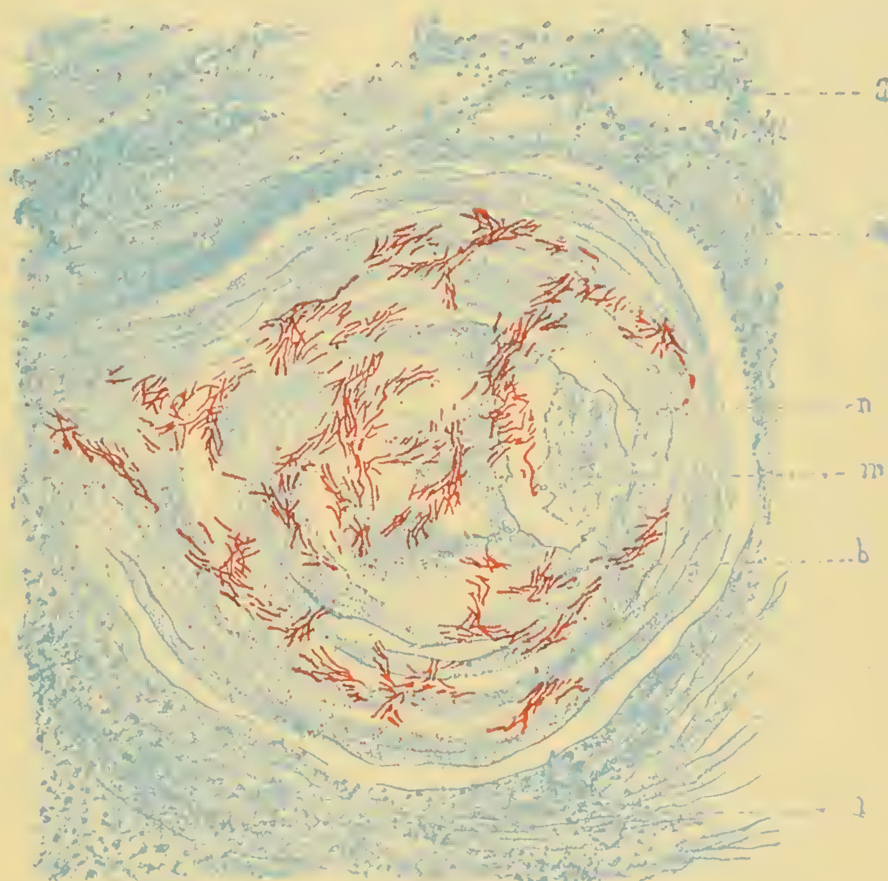


Fig. 266. — Tubercule fibreux du poumon (d'après Cornil et Babès).

a, tissu pulmonaire atteint de pneumonie interstitielle ; *b*, bacilles en forme de touffes situés entre les faisceaux ; *m*, petit séquestre situé au milieu d'une perte de substance dont les bords sont couverts de Bacilles ; *n*, fente située entre le tubercule et le tissu voisin. 500/1.

organes (fig. 266). Ces granulations se forment toujours à l'intérieur de capillaires, où se fixent les leucocytes qui transportent le microbe. On trouve dans la masse centrale, qui peut se nécroser, des proportions variables de Bacilles caractéristiques, libres ou contenus dans l'intérieur des *cellules géantes*, si constantes dans la tuberculose (fig. 255 et 267), qui pour Weigert (1) seraient uniquement produites par l'irritation causée par la présence de ces Bactéries dans une cellule, pour d'autres proviendraient de la fusion de plusieurs leucocytes. Lorsque la nécrose continue à se produire, la lésion s'étend et peut prendre alors de grandes

(1) Weigert, Zur Theorie der tuberkulöser Riesenzellen (*Deutsche med. Wochenschr.*, 1885).

proportions. C'est ainsi que se forment les *cavernes* dans les poumons tuberculeux dont les parois internes sont tapissées de masses caséeuses plus ou moins épaisses, où se rencontrent en très grande abondance les *Bacilles tuberculeux* (fig. 268, *a*). C'est ce processus de nécrose qui met en liberté les Bacilles dans la sécrétion des organes attaqués, et tout spécialement dans les crachats, dans la phtisie pulmonaire. On les y trouve tantôt rares, tantôt en grand nombre, formant de véritables amas; seuls ou le plus souvent avec d'autres que l'on distingue à leur moindre résistance à la décoloration, fréquemment avec le *Micrococcus tetragenus* qui se trouve également sur les parois des cavernes (fig. 269), avec des gros paquets de Sarcines, très fréquentes dans ces conditions, dont le rôle est absolument inconnu, ou avec d'autres espèces pathogènes ou saprophytes.



Fig. 267. — Cellule géante avec *Bacilles tuberculeux*.

Dès qu'une caverne est en effet formée, comme sa cavité est en communication avec les bronches, il y a apport possible de germes avec l'air. Ces germes, trouvant là un milieu favorable, y pullulent rapidement; les germes pathogènes ajoutent leurs effets spéciaux à ceux du *Bacille tuberculeux*; les saprophytes peuvent agir par leurs produits de sécrétion qui favorisent ou exaltent l'action des pathogènes, ou diminuent la résistance de l'organisme. On rencontre fréquemment les *Staphylocoques pyogènes*, le *Streptocoque pyogène*, ce qui a fait dire que le tuberculeux à cette période est en plus un pyémique. Le *Pneumocoque* se rencontre encore assez souvent, de même le *Pneumobacille*. On a signalé le *Bacillus pyogenes fœtidus*, le *Bacille pyocyanique*, le *Bacille de la diphtérie*, le *Bacille pseudo-diphtérique*, le *Bacille de l'influenza* de Pfeiffer. Le *Micrococcus tetragenus*, d'après Koch, pourrait même contribuer à la destruction du tissu pulmonaire. Le *Bacille des crachats verts*, de nombreux microbes des putréfactions, des *Levures*, ne peuvent aussi qu'avoir une action défavorable. Il existe souvent une réelle *association microbienne* qui produit ainsi un processus complexe, une véritable *infection mixte* (*Mischinfection*) qui est peut-être pour beaucoup dans l'établissement du processus fébrile et de la cachexie tuberculeuse (1).

Le Bacille paraît pouvoir se conserver virulent, même pendant longtemps, dans les tubercules crétacés, au milieu de la gangue calcaire. C'est ce qui résulte d'une observation de Haushalter (2), qui a déterminé la tuberculose chez le cobaye à la suite de l'inoculation de la partie centrale d'un pneumolithe de la grosseur d'un pois.

On rencontre aussi le *Bacillus tuberculosis* dans plusieurs autres affections que l'on est unanime maintenant à rattacher à la tuberculose, les abcès froids, des caries osseuses, une variété d'ostéite chronique, des affections cutanées, le lupus tuberculeux entre autres, où l'action nécrotique du parasite apparaît toujours évidente. Dans les cas de suppuration prolongée, les Bacilles sont souvent très rares, diffi-

(1) Spillmann, Les associations microbiennes et les infections mixtes (*Rapport au IVe Congrès français de méd.*, 1898).

(2) Haushalter, Persistance de la virulence du Bacille de Koch dans un tubercule crétacé (*Revue méd. de l'Est*, 1891, p. 150).

ciles à rencontrer dans le pus ; les inoculations et les cultures peuvent alors rendre plus de services que l'examen microscopique. Le pus peut même être véritablement amicrobien ou ne contenir que des

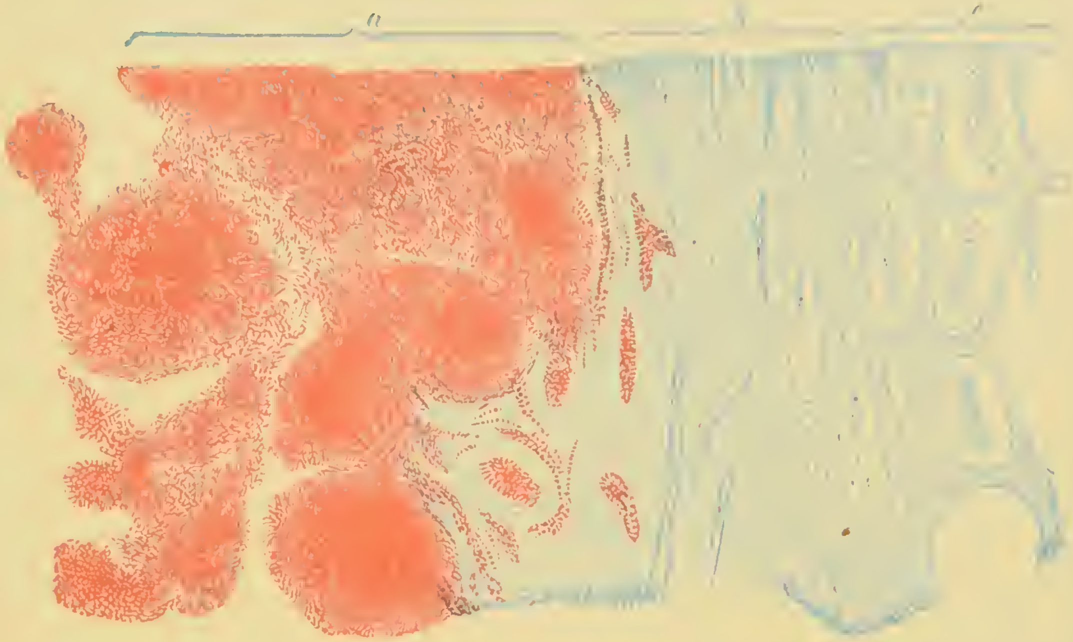


Fig. 268. — *a*, coupe à travers la paroi d'une caverne à face interne recouverte de grumeaux caséeux avec de nombreux *Bacilles tuberculeux*; *b*, paroi connective; *c*, parenchyme alvéolaire. 380/1 (d'après Rindfleisch).

Bacilles morts; les accidents sont dus aux matières toxiques qui les imprègnent.

Dans l'organisme atteint, les Bacilles sont d'ordinaire localisés aux lésions tuberculeuses. Dans les granulations grises, on en trouve surtout au centre; quand les tubercules se caséifient, ils deviennent de plus en

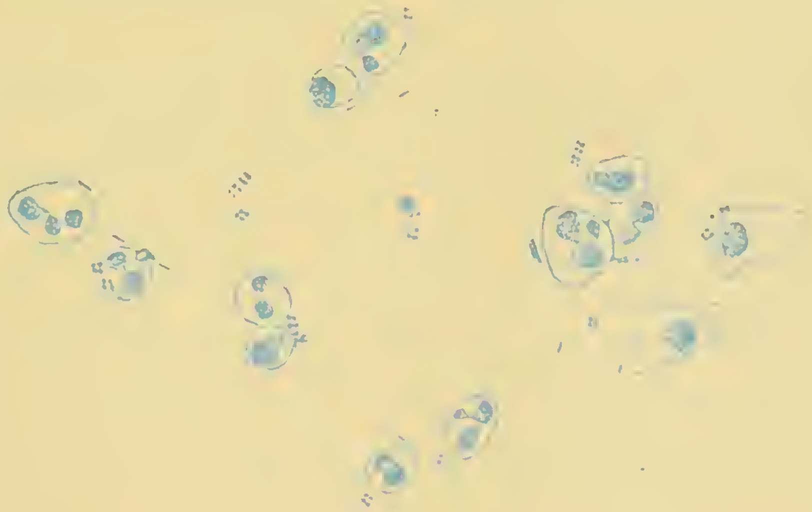


Fig. 269. — Crachats tuberculeux avec *Micrococcus tetragenus*.

plus rares dans les parties nécrosées et ne se rencontrent guère qu'à la périphérie. Ils peuvent, dans les cavernes, former de véritables amas sur les parois (fig. 268); ils envahissent parfois la lumière des petites artérioles ou des veinules situées contre les tubercules; c'est ce qui explique leur passage dans le sang.

On a en effet constaté la présence de *Bacilles tuberculeux* dans le

sang dans certains cas de tuberculose miliaire aiguë (1). Villemin avait du reste déjà annoncé que quelquefois le sang de tuberculeux recueilli à l'autopsie se montrait virulent. Les injections de tuberculine favoriseraient le passage des Bacilles dans le sang. On comprend que toute ouverture de foyer tuberculeux dans un vaisseau sanguin détermine le passage de Bacilles dans le sang ; si l'on n'en retrouve pas plus souvent, c'est qu'ils y sont rapidement détruits. Nocard (2) cependant avoue qu'il n'est jamais parvenu à rendre tuberculeux des cobayes auxquels il injectait dans le péritoine du sang de bovidés tuberculeux recueilli tout à fait aseptiquement. Jousset (3) avait conclu à la présence fréquente du Bacille dans le sang des tuberculeux, en appliquant sa méthode de l'*inoscopie* qui consiste à solubiliser le caillot sanguin par un suc gastrique artificiel et examiner le dépôt de la centrifugation du liquide obtenu.

D'après Bergeron (4), Jousset aurait rencontré d'autres Bacilles acido-résistants, communs dans le milieu extérieur ; en opérant de même, mais dans des conditions très rigoureuses, lui-même n'aurait jamais pu constater la présence du Bacille tuberculeux dans le sang des malades.

Le suc musculaire extrait par pression peut contenir des *Bacilles tuberculeux*, comme le prouvent des inoculations positives rapportées par plusieurs observateurs. Cette virulence est probablement due à la présence de Bacilles dans le sang ; elle a de l'importance au point de vue de la consommation des viandes d'animaux tuberculeux et des dangers que peuvent courir ceux qui s'en nourrissent. Les expériences faites avec les procédés les plus délicats, l'inoculation intrapéritonéale au cobaye surtout, démontrent que cette présence de *Bacilles tuberculeux* dans le muscle est chose assez rare, peut-être exceptionnelle, et qu'elle ne s'observe guère que quand la tuberculose est parvenue à une phase avancée.

On n'a rencontré que très rarement jusqu'ici le *Bacille tuberculeux* dans le lait chez la femme : l'observation de Roger et Garnier (5) est la seule qui soit nettement positive, basée sur l'inoculation au cobaye. Chez la vache, au contraire, de nombreuses expériences démontrent que le lait est souvent virulent.

Bien des expérimentateurs, Nocard en particulier, admettent que le lait ne renferme des Bacilles, et par conséquent n'est virulent, que quand la mamelle est le siège de localisations tuberculeuses : les lésions envahissant les parois de canaux excréteurs peuvent déverser des produits pathologiques dans leur intérieur.

Cependant, des expériences de Kempner et de Lydia Rabinowitch n'ont constaté de lésions mammaires que sur un petit nombre de vaches d'un lot d'animaux ayant manifestement réagi à la tuberculine

(1) Weichselbaum, Ueber Tuberkelbacillen im Blut bei allg. akuter Miliartuberkulose (*Wiener med. Wochenschr.*, 1884).

(2) Nocard, Les T. animales, p. 129.

(3) Jousset, Nouvelle méthode pour isoler le Bacille de Koch des humeurs de l'organisme (*Sem. méd.*, 1903, n° 3, p. 22).

(4) Bergeron, Étude critique sur la présence du Bacille de Koch dans le sang. Thèse de Paris, 1904.

(5) Roger et Garnier, Passage du Bacille de Koch dans le lait d'une femme tuberculeuse (*Soc. de Biol.*, 24 février 1900).

et qui, pour la plupart, donnaient un lait réellement infectieux pour le cobaye. Oestertag (1) a également rencontré du *Bacille tuberculeux* virulent chez des vaches ayant réagi à la tuberculine et ne présentant encore aucun symptôme clinique de tuberculose. Il semble bien que l'on doive admettre la possibilité du passage du Bacille tuberculeux dans la mamelle en apparence saine.

Il en est de même de beaucoup d'autres glandes, les glandes reproductrices en particulier, ce qui explique la possibilité de la rencontre de *Bacilles de la tuberculose* dans leurs produits de sécrétion.

TUBERCULOSE DE L'HOMME ET DES MAMMIFÈRES. — Il n'est guère de maladies qui frappent un aussi grand nombre d'espèces animales. L'homme lui paye un lourd tribut; c'est de beaucoup l'affection qui a presque partout la part la plus grande dans la mortalité ; dans bien des centres, elle est la cause du quart des décès.

Elle se présente chez l'homme sous les aspects les plus divers.

Elle atteint toutes les espèces de mammifères domestiques, très inégalement il est vrai.

La *tuberculose des bovidés*, *tuberculose bovine*, est très commune ; chez la vache, elle attaque souvent le poumon et la mamelle ; c'est la *pommelière*. Les vaches laitières soumises à une stabulation prolongée y sont surtout sujettes, principalement à cause de leur séjour dans des étables contaminées. La marche de la pommelière est ordinairement très lente et insidieuse; fréquemment l'animal garde une bonne apparence tout en étant porteur de lésions avancées. La mamelle est souvent atteinte. Les veaux sont très rarement tuberculeux; Nocard (2) donne la proportion de 1 à 5 p. 1000, comme moyenne observée dans les abattoirs ; Klepp (3) a obtenu 6,5 p. 1000 dans des conditions très défavorables, avec une bonne moitié des vaches tuberculeuses.

La question des rapports du Bacille tuberculeux humain et du Bacille tuberculeux bovin a été discutée précédemment (p. 679). Il a été conclu à une identité originelle probable, mais à une différenciation secondaire bien marquée des deux souches humaine et bovine, constituant, à la suite d'une longue accoutumance à leurs habitats spéciaux, deux *types* nettement distincts actuellement. Les différences qui les séparent ont été exposées pages 680 et 720.

Toutefois, chacun de ces deux types n'affecte pas seulement l'homme pour le premier, les bovidés pour le second, mais peut se rencontrer comme agent d'infection tuberculeuse dans les deux cas d'abord, puis chez d'autres espèces animales ensuite.

Le Bacille du type bovin peut occasionner la tuberculose chez l'homme; d'un autre côté, le Bacille du type humain peut être infectieux pour les bovidés (4).

(1) OESTERTAG, Untersuchungen über den Tuberkelbacillengehalt der Milch von Kühne, welche auf Tuberkulin reagirt haben, klinischen Erscheinungen der Tuberkulose aber noch nicht zeigen (*Zeitschr. für Hygiene*, XXXVIII. 1901, p. 415).

(2) NOCARD et LECLAINCHE, Les maladies microbiennes des animaux, 3e éd., II, 1903.

(3) KLEPP, Ueber angeborene T. bei Kälbern (*Zeitschr. für Fleisch und Milchhygiene*, 1896).

(4) PARK et KRUMWIEDE, The relative importance of the bovine and human types of tubercle bacilli in the different forms of human tuberculosis (*Studies from the research laboratory of New York*, V, 1910).

L'homme, adulte au moins, semble relativement peu sensible au Bacille bovin; ce qui diminue considérablement pour lui, il faut le reconnaître, le danger de contamination par le lait, la viande des bovidés tuberculeux. On a cependant beaucoup d'exemples de tuberculoses de l'homme causées par des Bacilles qui répondent absolument au type bovin. Les caractères principaux sont d'abord la virulence très marquée pour le lapin, qui, avec le type humain, ne présente souvent qu'une lésion locale ou rien du tout (p. 720). C'est ensuite l'épreuve de la virulence pour le bœuf, très concluante également : le Bacille bovin, inoculé au veau, par exemple, sous la peau à la dose de 5 milligrammes, donne, à part quelques exceptions, une tuberculose généralisée mortelle en un à deux mois; tandis que le Bacille humain, dans les mêmes conditions, ne peut pas produire de tuberculose généralisée, mais une simple lésion locale.

Park et ses élèves ont pu relever 1038 observations de tuberculose humaine dans lesquelles l'origine humaine ou bovine du Bacille a été déterminée par la culture et les inoculations d'épreuve. Ces observationsse répartissent ainsi d'après l'âge :

1re	catégorie :	686	individus	au-dessus de 16 ans.
2e	—	132	—	de 5 à 16 ans.
3e	—	220	—	au-dessous de 5 ans.

Sur les 686 personnes de la première catégorie, 677 ont montré du Bacille humain, soit 98,69 p. 100; 9 seulement, soit 1,31 p. 100, du Bacille bovin.

Sur les 132 de la deuxième catégorie, le Bacille humain a été rencontré 99 fois, 75 p. 100; le Bacille bovin 33 fois, 25 p. 100.

Sur les 220 enfants de la troisième catégorie, le Bacille humain a été trouvé 161 fois, 73,5 p. 100; le Bacille bovin 59 fois, 26,75 p. 100.

Le Bacille bovin ne serait donc réellement dangereux pour l'homme que dans le jeune âge.

La conclusion à tirer est que l'homme peut prendre sa tuberculose des bovidés, mais le fait est rare; l'ingestion des Bacilles bovins paraît la plupart du temps être inoffensive. *Le grand facteur de contamination tuberculeuse pour l'homme, c'est l'homme*; c'est de son côté que doivent porter les plus grands efforts dans la lutte antituberculeuse.

A leur tour, les bovidés peuvent prendre la tuberculose à Bacille humain. Une série de faits tendent à le démontrer.

Enfin, dans quelques cas de tuberculose du bœuf, on signale la présence du Bacille du type aviaire, qui aurait également été rencontré une fois chez l'homme par L. Rabinowitch (1).

La tuberculose est rare chez les petits ruminants, le *mouton* et surtout la *chèvre*; exceptionnelle chez le *cheval* et l'*âne* (2). Le type bacillaire qui intervient est d'ordinaire le type bovin; le Bacille aviaire a été constaté quelquefois chez le cheval.

(1) Rabinowitch, Untersuchungen über die Beziehungen zwischen der Tuberkulose des Menschen und der Thiere (*Arb. aus dem pathol. Inst. zu Berlin*. 1906).

(2) Blanc et Nocard, La T. de l'âne (*Congrès pour l'étude de la T.*, 1898).

Le *porc* est plus exposé que ces derniers animaux à prendre la tuberculose. Souvent la maladie a une marche chronique, compatible avec un état général satisfaisant; le poumon renferme de gros foyers caséeux, les ganglions sont pris, ceux de la base du cou sont gonflés, ce qui avait fait nommer cette forme *scrofulose du porc*. C'est le Bacille bovin que l'on trouve généralement chez le porc; on y a rencontré dans quelques cas le Bacille aviaire.

Les *singes* élevés dans nos pays meurent très souvent phtisiques. Le plus souvent, c'est le Bacille humain qui est en cause; cependant, on rencontre aussi du Bacille bovin et quelquefois du Bacille aviaire.

Le *chien*, le *chat* peuvent aussi devenir tuberculeux; dans ce cas, le plus souvent ces animaux vivaient avec des personnes tuberculeuses et devaient avoir été contaminés par elles (1). C'est surtout le Bacille humain que l'on y rencontre.

On a observé, dans des ménageries, la tuberculose chez beaucoup de *carnassiers sauvages*, due au Bacille bovin.

La tuberculose spontanée paraît être rare chez le *lapin* et le *cobaye*, si aptes à contracter la tuberculose expérimentale; Koch l'a observée une fois sur un lapin sauvage. C'est alors le Bacille bovin que l'on rencontre; toutefois Bang (2) signale du Bacille aviaire dans un cas de tuberculose spontanée du lapin. La plupart du temps, ce sont surtout des formes de pseudo-tuberculoses que l'on rencontre chez ces animaux.

Les *rats* et les *souris* prennent quelquefois la tuberculose; c'est le Bacille aviaire qui est présent.

Tuberculose des oiseaux. — La tuberculose des oiseaux est une affection fréquente. Elle frappe toutes les espèces d'oiseaux domestiques; les oiseaux de volière, les perroquets meurent très souvent tuberculeux et présentent souvent des lésions ulcéreuses externes qui disséminent facilement le contage. Il se produit dans les poulaillers de véritables épidémies de tuberculose à la suite du contact d'animaux tuberculeux, peut-être même, parfois, à la suite d'ingestion de crachats tuberculeux humains. La *tuberculose aviaire* (p. 681) a été considérée d'abord comme identique à la tuberculose humaine et bovine, puis comme absolument distincte. Il faut cependant reconnaître que les caractères donnés comme distinctifs ne peuvent pas absolument emporter la conviction.

Le foie, le poumon, la rate sont particulièrement atteints. On peut y trouver des nodosités assez grosses, homogènes ou ramollies au centre; le plus souvent, de fines granulations grises ou jaunâtres. Les Bacilles sont très nombreux dans ces lésions. On peut ne pas trouver de tubercules apparents; les organes, pâles et très friables, sont infiltrés d'une grande quantité de Bacilles.

Il est des tuberculoses d'oiseaux qui sont bien manifestement produites par des Bacilles humains ou bovins; c'est le cas pour les perroquets qui peuvent s'infecter dans le milieu domestique.

D'un autre côté, le Bacille aviaire peut, quoique très exceptionnellement, se rencontrer chez l'homme (p. 746); ou, plus souvent, dans la

(1) Cadiot, Contribution à l'étude de la T. chez les petits animaux (*Acad. de méd.*, 17 novembre 1896).

(2) Bang, Geflügeltuberkulose und Saügethiertuberkulose (*Centralbl. für Bakt.* Originale, XLVI, 1908, p. 461).

tuberculose spontanée de certains mammifères, le singe, le porc, le rat, la souris, peut-être le bœuf (1).

La tuberculose des volailles peut à la rigueur être considérée comme une menace pour l'homme; mais le danger semble trop minime pour que l'on doive pousser à prendre à cet égard des mesures de préservation rigoureuses.

TUBERCULOSE DES VERTÉBRÉS A SANG FROID. — Il semble bien que l'on doive admettre la possibilité de l'infection tuberculeuse chez les vertébrés à sang froid.

On a signalé chez plusieurs des cas de tuberculose spontanée. Le fait paraît en tout cas être très rare.

D'un autre côté, des expériences faites avec des produits tuberculeux ou des cultures virulentes démontrent que chez certaines espèces on peut produire une infection tuberculeuse véritable.

Plusieurs des cas de tuberculose spontanée signalés sont cependant sujets à critiques. Les caractères donnés peuvent paraître insuffisants aujourd'hui. L'auteur s'est parfois contenté, pour croire à la présence du *Bacille de la tuberculose*, des simples réactions de coloration ; or il existe de nombreuses espèces acido-résistantes qui abondent dans les herbes, les mousses, les conferves, milieux où vivent ces animaux, et se rencontrent même chez ces derniers à l'état normal, comme l'ont bien vu Weber et Taute (2). D'où, cause d'erreur notable.

Walter Sibley (3) a observé une tuberculose chez un *serpent* commun dans nos régions, la couleuvre à collier (*Tropidonotus natrix*). Mais sa détermination n'est basée que sur la seule réaction de coloration ; aussi doit-elle rester douteuse.

Dubard (4) a signalé ensuite l'existence de la tuberculose chez des *carpes*, déterminée probablement par l'ingestion de produits tuberculeux d'origine humaine, ingestion dont la nocuité est du reste démontrée par des expériences de Nicolas et Lesieur et celles de Bataillon, Dubard et Terre, dont il a été parlé plus haut (p. 722). Le Bacille isolé des tumeurs volumineuses que portaient ces poissons se distingue en ce qu'il végète activement de 10° à 30°, et très lentement à 37°. Les cultures du début diffèrent de celles du Bacille humain ou aviaire, mais prennent après quelques générations les caractères du dernier type. L'odeur des cultures en surface est identique à celle des cultures de tuberculose humaine. Les cultures du début ne sont virulentes ni pour le cobaye, ni pour le lapin, ni pour les oiseaux ; elles donnent, par contre, des lésions tuberculeuses aux carpes et cyprins dorés, grenouilles, crapauds, tritons, tortues, lézards, orvets, couleuvres et vipères (Voy. p. 723). Après plusieurs passages sur le cobaye et le lapin, il devient seulement possible d'obtenir la tuberculisation du cobaye. Ceci se rapproche de l'atténuation de la virulence du *Bacille*

(1) DE JONG, Rapport entre la tuberculose aviaire et celle des mammifères (*Ann. de l'Inst. Pasteur*, XXIV, 1910, p. 895).

(2) WEBER et TAUTE, Zur Frage der Umwandlung der Tuberkelbazillen im Kaltblüterorganismus (*Deutsche med. Wochenschr.*, 1904, n° 28, p. 1019).

(3) WALTER SIBLEY, T. bei Schlangen (*Virchow's Archiv.*, Berlin, Bd CXVI, 1889, p. 104).

(4) DUBARD, La T. des animaux à sang froid (*Revue de la T.*, 1898, p. 13). — KRAL et DUBARD, Étude morphologique et biologique sur le *Bacillus tuberculosus piscium* (*Ibid.*, p. 129).

tuberculeux par son passage chez les animaux à sang froid signalée plus haut (p. 728). Dubard propose de nommer son Bacille *Bacillus tuberculosis piscium*. D'après Ramond (1), ce *Bacille tuberculeux des poissons* ou *Bacille tuberculeux pisciaire* donnerait une tuberculine identique à celle obtenue avec le Bacille humain, ne produisant toutefois d'effets qu'à dose notablement plus élevée ; on a vu précédemment (p. 713) ce que l'on pouvait penser d'une telle assertion.

Friedmann (2) a étudié deux cas de tuberculose spontanée chez deux *tortues* de mer de l'aquarium de Berlin. Les poumons présentaient des lésions étendues, avec tubercules caséifiés et même cavernules. Il en a isolé un Bacille très voisin de celui de Bataillon, poussant facilement à 22° et aussi à 37°, en donnant au bout d'un certain temps des cultures très semblables à celles du Bacille humain. Il pousse même, mais lentement, à 13°-14°.

Inoculé aux animaux à sang froid, ce Bacille de la tortue envahit rapidement tous les organes. Chez la tortue, la couleuvre et le lézard, il produit des lésions miliaires ; chez l'orvet, une infection généralisée mortelle entre sept et cinquante-quatre jours ; chez la grenouille, une pullulation très active.

Chez le cobaye, à très hautes doses, on obtient la mort en quatre à huit jours, avec des lésions tuberculeuses ; à doses moyennes ou faibles, les lésions sont limitées, locales, et guérissent assez vite.

Chez le lapin, on ne détermine qu'une lésion locale, qui disparaît lentement.

Le chien, les rats et souris blanches, les oiseaux paraissent réfractaires ou tout au moins très peu influencés.

Dans un troisième cas de tuberculose de la tortue, Friedmann aurait isolé un Bacille identique au Bacille aviaire.

Küster (3) a rencontré trois cas de tuberculose spontanée de la *grenouille* ; Ruprecht (4) en donne un quatrième cas. Le foie présentait de nombreux tubercules grisâtres, renfermant des Bacilles acido-résistants. D'après Küster, les cultures sur gélose glycérinée rappellent celles du Bacille humain ; elles croissent au mieux à 28° et plus du tout à 37°. Elles seraient pathogènes pour les grenouilles et, en injection péritonéale, détermineraient chez le lapin et le rat la formation de nodules tuberculeux à la surface de la séreuse.

Bertarelli (5) a trouvé dans le foie d'un *lézard* de petits nodules avec cellules géantes, sans microbes.

Marco del Pont (6) a observé des cas de tuberculose spontanée chez la *salamandre* et l'*axolotl*, paraissant dus au Bacille pisciaire.

On peut conclure que la tuberculose spontanée des vertébrés à sang froid est une très grande rareté. Quant à l'identification des microbes

(1) Ramond, Sur une nouvelle tuberculine (*Soc. de Biol.*, 28 mai 1898).

(2) Friedmann, Der Schildkrötentuberkelbacillus seine Züchtung, Biologie und Pathogenität (*Deutsche med. Wochenschr*, 1903, n° 26, p. 464).

(3) Küster, Ueber Kaltblütertuberkulose (*Münchener med. Wochenschr.*, 1905, n° 2).

(4) Ruprecht, Ueber säurefeste Bacillen nebst Beschreibung eines Falles von Spontaner Froschtuberkulose. Thèses de Fribourg, 1904.

(5) Bertarelli, *Loc. cit.*, p. 723.

(6) Marco del Pont, Alcunas nuovas especies de Bacilos de la Tuberculosis y acido resistentes. Buenos-Ayres, 1906.

observés avec le Bacille tuberculeux vrai, elle est loin de pouvoir être faite d'une façon sûre, certains Bacilles pseudo-tuberculeux donnant des résultats bien semblables à ceux qui ont été signalés.

Reste l'infection tuberculeuse expérimentale déterminée chez les animaux de cette catégorie à l'aide de produits virulents d'origine humaine ou bovine.

Les recherches, citées précédemment (p. 722), de Bataillon, Dubard et Terre, de Nicolas et Lesieur, montrent qu'il est possible d'infecter des poissons avec du Bacille humain; celles de Bertarelli et Boutrin ont confirmé ces résultats à l'aide de cultures d'origine humaine, bovine et aviaire.

Moeller a donné la tuberculose à l'orvet avec des crachats tuberculeux.

Il semble que l'on doive admettre la possibilité au moins du développement du Bacille tuberculeux chez les animaux à sang froid, avec conservation de virulence le plus habituellement, sans qu'il paraisse subir de modification (1).

Il est encore bien difficile d'apprécier le rôle que peuvent jouer ces faits dans la dissémination du microbe et la prophylaxie de la tuberculose.

RECHERCHE ET DIAGNOSTIC

La recherche du *Bacille de la tuberculose* dans les produits, très variés, qui peuvent être suspectés de le contenir, comporte une série d'opérations qu'il peut être nécessaire de mettre en œuvre pour arriver à formuler une opinion bien assise et surtout à porter le diagnostic ferme de tuberculose chez le porteur qui les a fournis.

La valeur de chacune de ces diverses opérations est variable, comme il sera dit à propos de chacune d'elles. Les unes, les plus nombreuses, n'ont qu'une valeur relative ; elles présentent des causes d'erreur qu'il est nécessaire de connaître à fond pour en faire la critique d'une façon sérieuse. D'autres sont à placer au premier rang ; l'inoculation au cobaye, dans des conditions exposées page 719, est de beaucoup la méthode la plus probante jusqu'ici.

Les différentes méthodes que l'on peut employer seront étudiées dans l'ordre suivant :

1° L'examen microscopique ;
2° Les cultures ;
3° L'inoculation au cobaye ;
4° L'emploi de la tuberculine ;
5° L'agglutination ;
6° La précipito-réaction ;
7° La fixation du complément ;
8° La recherche de l'indice opsonique ;
9° Le cytodiagnostic.

(1) Gottstein, Das Verhalten des Tuberkelbacillen ein Kaltblüter organismen (*Hygienische Rundschau*, 1905, p. 281).

1° RECHERCHE ET DIAGNOSTIC PAR LE MICROSCOPE.

L'examen microscopique, après usage des méthodes de coloration dont les principales ont été exposées pages 691 et suivantes., est la plus ancienne méthode employée. Elle doit l'être encore, dans tous les cas, mais comporte des réserves importantes. Le *Bacille tuberculeux* n'est pas, en effet, la seule espèce, ou à peu près, qui reste colorée dans les conditions mises en œuvre, comme on l'a cru longtemps; d'autres espèces, nombreuses, conservent également la coloration par les procédés employés. C'est d'abord le *Bacille de la lèpre*, le *Bacille du smegma*, les plus anciennement connus, puis les nombreux Bacilles acido-résistants qui seront étudiés plus loin sous le nom de *Bacilles pseudo-tuberculeux*. Une différenciation complète est devenue nécessaire; les éléments pour y parvenir seront indiqués plus loin.

La recherche du *Bacille de la tuberculose* se fait dans des produits très divers, liquides, sérosités, humeurs physiologiques ou pathologiques, tissus des différents organes, poussières, etc. Comme on s'adresse le plus souvent à l'examen des crachats, pour le diagnostic de la tuberculose humaine qui est si souvent pulmonaire, il est surtout utile de donner des détails complets à ce sujet; c'est en quelque sorte une opération courante que tous les médecins doivent pouvoir pratiquer d'une façon suffisamment minutieuse.

Recherche du Bacille de la tuberculose dans les crachats. — Les crachats tuberculeux n'ont pas, à vrai dire, de caractères macroscopiques spéciaux. Ils peuvent avoir des aspects très divers, être rares ou abondants, liquides ou visqueux, grisâtres ou jaunâtres, parfois colorés par du sang; ils peuvent être muqueux ou plus ou moins purulents.

Il faut se souvenir qu'on ne peut trouver de *Bacille tuberculeux* dans les crachats que s'il existe déjà des foyers ramollis en communication avec les bronches; dans la tuberculose miliaire aiguë, les Bacilles font le plus souvent défaut. Il est à recommander de se servir surtout des premiers crachats du matin et de faire l'examen sur les crachats aussi fraîchement recueillis possible. Lorsqu'on a affaire à de petits enfants qui ne crachent pas, mais avalent leurs crachats, on peut, pour rechercher le Bacille, s'adresser aux mucosités du pharynx que l'on se procure à l'aide de tampons, ou extraire de l'estomac, par un petit lavage fait le matin à jeun, des parcelles de crachats dégluties, ou encore faire les recherches sur les selles.

Les crachats seront recueillis dans des récipients bien nettoyés et fermés. Au moment de l'examen, ils seront versés dans une boîte de Petri bien propre, même stérilisée, c'est encore préférable; ils y seront étalés pour qu'il soit possible de se rendre compte des particularités qu'ils présentent et de la répartition de leurs différentes parties, flocons purulents, amas d'autre nature, etc.

Examen direct. — Pour les préparations destinées à l'examen, il faut choisir de préférence les grumeaux jaunâtres qui se rencontrent dans les crachats, en les dissociant s'il le faut avec un fil de platine. On en étale largement une petite portion sur la lamelle bien propre, ou on écrase les grumeaux entre deux lamelles pour obtenir une couche assez

mince. Il peut suffire de plonger à plusieurs reprises le fil de platine dans les parties épaisses des crachats et d'étaler sur les lamelles les petites quantités de substance ainsi ramenée.

La lamelle ainsi préparée doit être desséchée à une douce température, puis fixée par passage à trois reprises dans la flamme bleue d'un bec de Bunsen (Voy. p. 367). Elle peut être soumise aux méthodes de coloration. Un certain nombre ont été exposées précédemment (p. 689).

On a préconisé de nombreuses méthodes de coloration à appliquer aux crachats tuberculeux. Deux surtout paraissent faciles et commodes, la coloration par le *procédé d'Ehrlich* et celle par le *procédé de Ziehl-Nelsen* qui est la méthode de choix, dans les conditions qui ont été exposées plus haut (p. 691). Le *procédé de Kühne* (p. 692), le *procédé de Hauser* (p. 693) sont également très recommandables.

D'après Lucibelli (1), dans les crachats conservés, très peu riches en Bacilles, le *Bacille tuberculeux* pourrait perdre rapidement sa colorabilité.

Lorsqu'on décolore aux dilutions d'acides minéraux, il est à recommander de ne pas laisser les préparations soumises trop longtemps à l'action du décolorant; le *Bacille de la tuberculose* peut en effet se décolorer après une action de dix à quinze minutes de durée. L'usage des acides organiques comme décolorants permet d'éviter facilement cette cause d'erreur (p. 693).

Il y a avantage à soumettre les préparations colorées et lavées à une double coloration. On choisit alors comme colorant de fond une couleur qui tranche bien avec la première; avec la fuchsine on prend le bleu de méthylène, avec les violets la vésuvine ou l'éosine. Cette coloration de fond doit toujours être légère. Elle permet de mieux étudier la préparation et surtout de se rendre un compte beaucoup plus exact des éléments autres qu'elle peut contenir, éléments cellulaires ou autres microbes dont la constatation peut être importante pour un diagnostic complet.

Les préparations faites sont examinées au microscope avec condenseur, à l'aide d'un fort objectif à sec ou d'un objectif à immersion. L'emploi d'une vive lumière, telle que celle qu'on obtient avec une large ouverture, ou même la suppression complète du diaphragme, est souvent à recommander; ce moyen fait disparaître bien des détails pour faire ressortir les parties vivement colorées comme les Bacilles.

Les *Bacilles tuberculeux* des crachats peuvent avoir des aspects très divers. Ils sont petits ou grands, souvent pliés ou courbés, droits ou moniliformes, parfois cocciformes; complètement homogènes ou montrant les vacuoles dont il a été parlé plus haut (p. 687). On les trouve isolés, réunis en petit nombre ou en amas plus ou moins volumineux; ils sont libres ou inclus dans des cellules d'épithélium alvéolaire ou des globules de pus.

Les éléments cellulaires que l'on peut rencontrer dans les crachats proviennent du poumon ou de la cavité buccale. Ce sont des cellules de l'épithélium alvéolaire, arrondies, à gros noyaux, des globules de pus, des fibres élastiques, indices de la destruction du parenchyme pulmonaire; quelquefois, des cellules cylindriques de l'épithélium des

(1) Lucibelli, *Gazz. degli Osped.*, 26 novembre 1899.

bronches, de la trachée ou du larynx ; des globules rouges ; des cellules épithéliales de la bouche, grandes, plates, polygonales, à angles souvent aigus. D'après Czaplewski (1), certaines cellules kératinisées, des noyaux de *mastzellen*, résistent partiellement à la décoloration.

Les crachats peuvent contenir de nombreux microbes autres que le *Bacille de la tuberculose*, provenant des lésions tuberculeuses envahies secondairement, du mucus bronchique, de la cavité buccale, ou les Bacilles résistants similaires. Le *Micrococcus tetragenus*, le *Streptocoque pyogène*, les *Staphylocoques pyogènes* sont fréquents ; diverses espèces de *Sarcines*, des espèces de putréfaction de formes très variées se rencontrent souvent sans que leur constatation puisse donner d'indication très précise ; cependant, quand ces Bactéries sont très nombreuses, qu'elles sont réunies en grand nombre, formant des filaments longs, des amas notables, des chaînettes à beaucoup d'éléments, on peut en induire qu'il doit y avoir stagnation dans le poumon ou les bronches, permettant une sorte de culture des microbes et une prolifération active. On trouve aussi fréquemment de longs filaments de *Leptothrix* ; on a signalé la présence de massues d'*Actinomyces*, de filaments de *Cladothrix*, de filaments de mycélium de Champignons, de Levures de l'air, du muguet.

Enfin, on peut y rencontrer des cristaux divers : quelquefois des cristaux de leucine ou de tyrosine, très rarement de cholestérine ; des cristaux d'hématoïdine ; surtout de petits cristaux aciculaires d'acides gras qui se colorent bien aux couleurs d'aniline et résistent parfois à la décoloration par les acides, pouvant ainsi en imposer pour des *Bacilles tuberculeux*. On distinguera ces dernières formations à leur forme régulière, leur forte réfringence, leurs arêtes droites et surtout à ce qu'elles disparaissent très vite lorsqu'on les soumet à l'action d'une lessive alcaline.

Il n'y a guère d'indications formelles à tirer d'une façon certaine, pour le pronostic, du nombre, de la forme, de l'arrangement des *Bacilles tuberculeux* dans les crachats, ainsi que de la nature des différents autres microbes qui peuvent s'y trouver.

Il semble cependant que la richesse des crachats en Bacilles ait un certain rapport avec l'état des lésions et puisse être regardée comme ayant une certaine valeur pronostique. Des Bacilles très nombreux indiquent souvent une forme sévère de tuberculose. Une diminution du nombre précédemment constaté correspond plutôt à une amélioration des lésions ; une augmentation croissante à une aggravation ; mais il faut que cette diminution soit bien nettement établie.

Ces données sont loin cependant de pouvoir être considérées comme ayant une valeur absolue ; les variations dépendent souvent des conditions dans lesquelles la préparation a été faite.

Pour permettre et formuler l'appréciation, Gaffky (2) a établi, d'après le nombre des Bacilles constatés, dix classes, caractérisées chacune comme il suit :

(1) Czaplewski, Die Untersuchung des Auswurfs. Iéna, 1891.
(2) Gaffky, Ein Beitrag zum Verhalten der Tuberkelbacillen im Sputum (*Mitt. aus d. Kaiserl. Gesundheitsamte*, II, 1884, p. 126).

Classe	I.	De 1 à 4 Bacilles dans toute la préparation.
—	II.	Seulement 1 Bacille pour plusieurs champs du microscope.
—	III.	1 Bacille en moyenne à peu près par champ du microscope.
—	IV.	2 ou 3 Bacilles en moyenne — —
—	V.	4 à 6 — — — —
—	VI.	7 à 12 — — — —
—	VII.	Bacilles assez nombreux — —
—	VIII.	Bacilles nombreux — —
—	IX.	Bacilles très nombreux — —
—	X.	Quantité énorme de Bacilles — —

Pour établir une moyenne raisonnable, il faut faire la numération des Bacilles au moins dans une vingtaine de champs microscopiques divers et établir la moyenne des résultats obtenus.

La forme des Bacilles que l'on peut observer présente des variations assez grandes. Ils sont longs ou courts, parfois presque semblables à des coccus; d'autres fois très gros, même ramifiés ou renflés en massue. Il est bien difficile d'en tirer des déductions réellement valables. Cependant on peut penser que les Bacilles longs, prenant fortement la coloration, proviennent d'une affection en activité ; tandis que lorsqu'ils se colorent mal, sont en quelque sorte en désagrégation, le processus rétrograderait plutôt. Mais ces signes n'ont qu'une valeur relative et pas du tout absolue.

A côté des Bacilles acido-résistants, on peut rencontrer de nombreux microbes autres, se décolorant par la méthode et se teignant différemment alors avec un colorant de fond.

Il y a fréquemment des formes très variées, coccus, bâtonnets, filaments courbes, spiralés, filamenteux. Les coccus sont en amas, en chaînettes ou en diplocoques; ils sont parfois capsulés. L'aspect, mais surtout les cultures sur milieux habituels, permettent de reconnaître un certain nombre d'espèces qui peuvent parfois fournir d'utiles indications. C'est surtout le *Pneumocoque*, le *Staphylocoque doré*, le *Streptocoque pyogène*, le *Tétragène*, le *Micrococcus catarrhalis*, des *Sarcines*, du *Pneumobacille*, du *Bacille pyocyanique*, des formes de *Spirilles* et de *Spirochètes*, des filaments de *Leptothrix* ou de *Cladothrix*, des *Levures* ou *Formes-levures*, des filaments de *Mucédinées* diverses, *Moisissures*, *Oïdiums*, *Monilia*, *Torula*.

Généralement, l'abondance des microbes observés doit faire penser à un séjour prolongé du produit dans le poumon, déterminé soit par une lésion cavitaire de son tissu, soit par une dilatation des bronches ou quelque difficulté d'expulsion de leur contenu. La pullulation de germes nombreux dans les lésions pulmonaires, et tout particulièrement de germes pyogènes, ne peut avoir qu'une influence mauvaise sur l'état du malade et la marche de l'infection ; le tuberculeux se double ainsi souvent d'un pyémique.

On constate, dans les préparations faites avec les méthodes habituelles, des éléments autres que les microbes, pouvant fournir des renseignements sur l'état du poumon. Ils peuvent être intéressants à connaître; on y arrive mieux en usant de méthodes histologiques appropriées (1). C'est surtout du mucus, de la fibrine, des cellules d'épithélium bronchique ou alvéolaire, des globules de pus, des fibres élastiques dont

(1) Israels de Jong, Étude histochimique et cytologique des crachats. Paris, Steinheil, 1907.

la présence indique un processus destructif du tissu pulmonaire, des globules rouges.

Homogénéisation des crachats. — Pour retrouver plus facilement les *Bacilles de la tuberculose* dans les crachats, surtout lorsqu'ils s'y trouvent en très petite quantité ou que l'expectoration est très abondante, on a proposé de dissoudre le mucus et les éléments qui les contiennent de façon à obtenir un liquide *homogène*, peu ou pas visqueux, ne tenant en suspension que certains éléments qui ont résisté au traitement, en particulier les Bacilles. En laissant sédimenter un tel liquide, ou mieux en le soumettant à la centrifugation, on peut alors trouver, dans une petite parcelle du dépôt, des Bacilles qui étaient épars dans une grande masse de produit. Ces procédés permettent souvent d'obtenir des résultats positifs alors que la méthode ordinaire a échoué.

Procédé de Biedert. — Biedert (1) traite les crachats par la soude de la façon suivante : 15 centimètres cubes de crachats environ sont mélangés et agités avec deux cuillerées à bouche d'eau ; on ajoute, suivant le degré de viscosité du mélange, 4 à 8 gouttes de lessive de soude : on ajoute de 4 à 6 cuillerées d'eau et l'on chauffe dans une capsule à l'ébullition jusqu'à ce que le liquide soit devenu fluide et bien homogène. On laisse déposer quarante-huit heures dans un verre conique; on décante avec soin et l'on fait des préparations avec le sédiment.

Par suite d'une action trop forte de l'alcali, les Bacilles peuvent perdre leur colorabilité. Aussi, Biedert (2) a-t-il modifié de la façon suivante la manière de faire : On agite à froid une cuillerée de crachats avec deux cuillerées d'eau et 4 à 8 gouttes de lessive de soude ; on laisse reposer cinq minutes et l'on recommence à agiter jusqu'à liquéfaction presque complète. On fait alors bouillir le tout en agitant la capsule et l'on ajoute 4 à 6 cuillerées d'eau.

On laisse déposer et dans le dépôt, après décantation, on choisit une parcelle que l'on fixe sur la lamelle avec une petite quantité du crachat tel qu'il est expectoré. On colore au procédé choisi. L'emploi du centrifugeur permet d'opérer plus vite et surtout d'éviter un contact prolongé avec le milieu alcalin.

Kühne (3) traite les crachats par le borax qui les rend moins visqueux, mais ne les liquéfie pas aussi complètement que la soude. Ilkewitsch (4) préconise la potasse.

Il est bon d'être prévenu que les éléments du *Bacille de la tuberculose* deviennent un peu plus épais par l'action des alcalis; leur réaction de coloration n'est pas modifiée, tandis que, dans les mêmes conditions, le *Bacille du smegma* et d'autres acido-résistants ne restent pas colorés.

Procédé de Spengler. — Spengler (5) recommande de traiter les crachats par la pancréatine qui solubilise presque tout ce qu'ils contiennent et favorise ainsi la sédimentation des Bacilles.

Les crachats sont versés dans un verre conique et agités avec une

(1) Biedert, *Berlin. klin. Wochenschr.*, 1886, nos 42 et 43 ; 1891, no 2, p. 32.

(2) Biedert, *Deutsche med. Zeitschr.*, 1891, p. 333.

(3) Kuhne, Die Untersuchung von Sputum auf Tuberkelbacillen (*Centralbl. für Bakt.*, VIII, 1890, p. 293).

(4) Ilkewitsch. Eine neue Methode zur Entdeckung von Tuberkelbacillen in Sputum Schwindsüchtiger (*Centralbl. für Bakt.*, XV, 1894, p. 152).

(5) Spengler, Pankreatinverdauung des Sputums zum Sedementiren der Tuberkelbacillen (*Deutsche med. Wochenschr.*, 1895, no 15).

quantité d'eau distillée au moins égale, supérieure s'ils sont très consistants. Lorsque la répartition est bien faite, on ajoute quelques gouttes d'une solution concentrée de soude. On fait dissoudre de 0gr,1 à 1 gramme de poudre de pancréatine dans un peu d'eau et, après filtration, on verse dans le verre en ayant soin de bien mélanger. Le verre est placé à l'étuve, à 37°. Après deux à trois heures de séjour à l'étuve, on ajoute de 0gr,1 à 1 gramme d'acide phénique pour empêcher la putréfaction. De douze à vingt-quatre heures, la liquéfaction peut être complète ; s'il existe encore des grumeaux, on ajoute un peu de soude, on agite et on laisse quelques heures en repos. L'emploi de la centrifugation permet d'opérer plus rapidement et d'obtenir un dépôt plus complet. Ce procédé fournit de bons résultats.

Procédé de Joussel. — Le procédé d'*inoscopie* de Joussel (1) fait intervenir la solubilisation par un suc gastrique artificiel ainsi composé :

Pepsine en paillettes	2 grammes.
Glycérine pure	10 cent. cubes.
Acide chlorhydrique à 22° B	10 —
Fluorure de sodium	3 grammes.
Eau distillée	Q. S. p. 1 litre.

Les crachats sont additionnés de 10 à 30 centimètres cubes de suc gastrique artificiel et placés à l'étuve vers 37° pendant deux ou trois heures, plus même si la liquéfaction est lente. Le liquide obtenu est centrifugé et la recherche des Bacilles se fait avec le culot de centrifugation.

Procédé à l'antiformine. — On a nommé *antiformine* un produit commercial (2) employé avantageusement comme désinfectant, composé d'eau de Javel et de lessive de soude contenant environ pour 100 7,5 d'hydrate sodique libre et 5,6 d'hypochlorite (5gr,3 de chlore pour 100). Son action a été étudiée par Uhlenhuth et Xylander (3), qui en ont fait une application très intéressante à la recherche du *Bacille de la tuberculose*.

En solution, dans l'eau, à 2 à 5 p. 100, l'antiformine détruit en moins de cinq minutes la plupart des Bactéries. Si l'on fait agir ces solutions sur le *Bacille typhique*, le *Bacille dysentérique*, le *Bacille de la morve*, le *Bacille de la peste*, la dissolution des microbes se fait progressivement ; elle est absolument complète en dix à quinze minutes, le liquide reste entièrement limpide. L'effet est attribué à l'action combinée du chlore et de l'alcali. Il est des microbes qui résistent plus. Pour détruire les spores charbonneuses, il faut faire agir une solution à 10 p. 100 et laisser en contact au moins douze heures. Le *Bacille de la tuberculose* résiste beaucoup, à cause de son imprégnation par les matières grasses ou cireuses ; il en est de même d'ailleurs pour toutes les espèces acido-résistantes, à des degrés divers en rapport avec leur acido-résistance. En se basant sur ce caractère, on peut isoler le *Bacille de la tuberculose* des autres microbes en mélange.

(1) Jousset, Nouvelle méthode pour isoler le Bacille de Koch des humeurs de l'organisme (*Sem. méd.*, 14 et 21 janvier 1903).

(2) Produit patenté par Axel Sjöo et Törnell. Se trouve dans le commerce, particulièrement chez Oskar Kühn, Dirksenstrasse, à Berlin; E. Merck, à Darmstadt.

(3) Uhlenhuth et Xylander, Untersuchungen über Antiformin, ein bakterienauflösendes Desinfectionsmittal (*Arb. aus dem Kaiserl. Gesundheitsamte*, XXXI, 1909, p. 158).

On procède, pour la recherche dans les crachats, de la façon suivante : 20 à 30 centimètres cubes de crachats sont additionnés de 15 centimètres cubes d'antiformine, puis d'eau en quantité suffisante pour obtenir 100 centimètres cubes. Après deux à cinq heures de contact, on ne trouve plus dans le liquide que de petites particules qui flottent.

Elles sont constituées par des amas de *Bacilles de la tuberculose*. En en recueillant suffisamment avec une öse et en faisant des préparations que l'on colore aux méthodes habituelles, on constate aisément la présence du microbe. On peut même obtenir des cultures directes en reportant ces parcelles sur sérum coagulé, puis sur gélose glycérinée.

Ce procédé donne en particulier de très bons résultats quand on a affaire à des crachats provenant de cavernes dont les Bacilles sont souvent noyés dans des masses caséeuses abondantes, d'ordinaire très riches en microbes variés, qui peuvent rendre la recherche du *Bacille tuberculeux* difficile et aléatoire avec les méthodes ordinaires.

Procédé à la ligroïne. — Lange et Nitsche (1) ont remarqué qu'en agitant fortement des crachats homogénéisés avec un peu d'éther de pétrole, de benzine, de xylol, ou mieux de ligroïne, éther de pétrole qui bout de 90° à 120°, de façon à obtenir une sorte d'émulsion du carbure d'hydrogène, il se produisait, avec les gouttelettes de ce dernier une sorte d'adhérence du *Bacille de la tuberculose* qui le séparait du liquide aqueux. Par le repos, on observe alors, à la partie inférieure de la couche d'éther de pétrole qui se rassemble en haut, au point de sa séparation avec le liquide aqueux, une zone blanchâtre formée par les Bacilles réunis. On procède ainsi qu'il suit : 5 centimètres cubes de crachats sont additionnés de 50 centimètres cubes de solution normale de soude ; on laisse l'homogénéisation se faire soit à la température de la chambre, soit à l'étuve, ce qui va plus vite, en agitant assez fréquemment. On ajoute 50 centimètres cubes d'eau et on agite pour bien mélanger ; puis 2 centimètres cubes environ de ligroïne et on agite fortement pour émulsionner. Le tout est alors chauffé au bain-marie vers 60°-65°, pour obtenir la séparation rapide du carbure. On prélève ensuite de cette couche inférieure de la ligroïne pour faire des préparations. Les *Bacilles pseudo-tuberculeux* se comportent comme le *Bacille de la tuberculose*.

Procédé de Jacobson. — Jacobson (2) fait intervenir successivement l'action de l'antiformine et celle de la ligroïne. Les crachats, légèrement dilués dans de l'eau distillée en dissociant les grumeaux quelque peu volumineux, sont additionnés de cinq fois leur volume de solution d'antiformine à 10 p. 100. La liquéfaction est complète après deux ou trois heures à 37°. On ajoute alors de la ligroïne en quantité suffisante pour former une couche de 2 à 3 millimètres d'épaisseur. On agite fortement et on met une demi-heure à l'étuve pour laisser remonter la ligroïne. Les Bacilles entraînés viennent former une zone blanchâtre à la base de la couche de ligroïne. On prélève des particules de cette zone et l'on en fait des préparations. On peut ainsi constater la présence de Bacilles dans des crachats qui n'en renferment que très peu et où l'on n'en découvrirait pas avec les méthodes ordinaires.

(1) Lange et Nitsche, Eine neue Methode des Tuberkelbazillen nachweisses (*Deutsche med. Wochenschr.*, 1909, p. 435).
(2) Jacobson, *Soc. de Biol.*, 1909.

Recherche du Bacille de la tuberculose dans le sang, le pus, différents liquides de l'organisme. — Les méthodes à employer sont en tout semblables à celles qui viennent d'être exposées pour les crachats. Lorsque les Bacilles sont rares, il faut une très grande patience et de nombreuses préparations. On peut aussi *homogénéiser* le tout à l'aide de dissolvants, comme il vient d'être indiqué pour les crachats, centrifuger et opérer sur le dépôt.

Pour les liquides très fluides, liquides pleurétique et ascitique, urine, on peut les laisser sédimenter ou plutôt les soumettre d'abord à la centrifugation et faire les recherches sur les sédiments. Il vaut souvent mieux employer l'inoculation au cobaye.

Dans le cas de méningite tuberculeuse, Schwartz (1) recommande l'examen du liquide céphalo-rachidien obtenu par la ponction lombaire. Ce liquide, centrifugé ou laissé en repos vingt-quatre heures, laisse déposer des grumeaux avec lesquels on fait des préparations suivant les méthodes habituelles.

Pour les liquides spontanément coagulables, Jousset recommande sa méthode inoscopique dont il vient d'être parlé (p. 756). C'est le cas pour le sang ou beaucoup d'autres sérosités. On peut même produire artificiellement la coagulation en ajoutant au liquide du plasma salé. La fibrine, en se coagulant, colle le liquide et entraîne les Bacilles en suspension. Le caillot compact ou les flocons sont lavés sur une compresse bouillie, puis mis à digérer dans le suc gastrique artificiel. A l'étuve à 38°, en agitant toutes les demi-heures, la digestion se fait en deux à trois heures. En chauffant au bain-marie vers 50°, mais pas au-dessus, elle se fait plus rapidement. Après complète liquéfaction, on fait des préparations avec le dépôt.

Recherche du Bacille de la tuberculose dans l'urine. — Cette recherche est délicate et souvent aléatoire; les Bacilles, souvent rares, peuvent facilement échapper à l'observation. Elle se fait dans le dépôt obtenu naturellement par le repos ou mieux par centrifugation. Ce dépôt est utilisé directement, des préparations étant faites avec les grumeaux ou flocons que l'on y trouve; ou bien après homogénéisation, surtout emploi de l'antiformine, comme il a été dit plus haut pour les crachats.

Il faut se souvenir que l'urine contient souvent des Bacilles acido-résistants autres, surtout du *Bacille du smegma* (Voy. p. 781).

L'inoculation du dépôt au cobaye est un procédé beaucoup plus sûr, qui est toujours nécessaire pour donner une conviction.

Recherche du Bacille de la tuberculose dans le lait et le beurre. — On laisse le lait en repos, pendant un jour ou deux, au froid, et l'on recherche les Bacilles dans le sédiment (2). On peut aussi de préférence soumettre de suite le lait à la centrifugation: il se sépare en trois couches, une formée de crème, une autre de lait écrémé, la troisième, inférieure, d'impuretés; cette dernière renferme surtout les Bacilles. On a aussi conseillé de traiter le lait par de l'acide acétique cristallisable; la caséine se précipite en entraînant les corps en suspension. On recherche les Bacilles dans les flocons de caséine par

(1) Schwartz, *Arch. für klin. Med.*, LX, 1898, nos 2 et 3.

(2) Brugi, Ueber die Untersuchung der Milch auf Tuberkelbacillen. Inaugural Dissertation. Halle, 1896.

les procédés ordinaires. Toutes ces méthodes sont peu sûres, parce que, le plus souvent, les *Bacilles tuberculeux* sont très peu nombreux dans les laits contaminés; de plus, le lait peut renfermer des Bacilles acido-résistants autres, il est bon d'en être prévenu. Il vaut mieux, ici aussi, s'adresser à l'inoculation intrapéritonéale au cobaye. On peut aussi centrifuger le beurre maintenu fondu.

Recherche du Bacille de la tuberculose dans les tissus. — On peut employer les procédés de coloration décrits précédemment pour les crachats, en opérant sur des coupes faites sur des tissus convenablement fixés au préalable. Les méthodes de fixation qui paraissent donner les meilleurs résultats sont l'emploi de la liqueur de Flemming ou celui du sublimé à saturation dans l'eau avec addition de 5 p. 100 d'acide acétique cristallisable. Avec cette dernière solution, les morceaux de poumons sont convenablement fixés au bout de douze heures. Borrel (1) recommande comme procédé de coloration le procédé de Kühne au chlorhydrate d'aniline (p. 692). La méthode de coloration de Much (p. 694) peut être avantageusement appliquée aux coupes (2).

Il faut, autant que possible, éviter, avant coloration, l'emploi d'éther, de xylol, et même d'alcool, qui peuvent dissoudre la matière cireuse spéciale à laquelle sont dues les particularités de coloration, et supprimer la réaction ou, tout au moins, l'atténuer.

2° Recherche par les cultures.

La recherche du *Bacille de la tuberculose* se fait rarement par la mise en culture directe du produit à examiner où ce microbe existe rarement seul. D'autres espèces, souvent même nombreuses, l'accompagnent généralement et, se développant plus vite et plus abondamment que lui, envahissent de suite le milieu. De plus, quand cet obstacle ne se présente pas, le développement toujours lent de ce Bacille ne permet qu'un diagnostic assez tardif.

Les cultures s'obtiennent facilement après inoculation au cobaye, comme il a été dit page 694.

On a même vu des crachats qui le renfermaient en telle abondance, à l'exclusion d'autres espèces, que l'ensemencement a donné d'emblée des cultures pures ; mais le fait est tout à fait exceptionnel. On peut arriver à obtenir assez facilement des cultures par ensemencement direct des produits, en mettant en œuvre certains procédés spéciaux qui ont été exposés page 695. Mais, dans la pratique, cette méthode de recherche est loin de valoir l'examen microscopique et l'inoculation au cobaye.

3° Recherche par l'inoculation.

L'inoculation au cobaye est un moyen de recherche des plus sensible, pouvant donner des résultats positifs quand les méthodes de

(1) Borrel, T. pulmonaire expérimentale (*Ann. de l'Inst. Pasteur*, II, 1873, p. 593).

(2) Lier, Ein Beitrag zum Nachweis des Tuberkelbazillus in Gewebe (*Centralbl. für Bakt.*, Originale, LI, 1909, p. 678).

recherche microscopique ont échoué. Il est à recommander d'y recourir dans tous les cas douteux.

L'inoculation de produits pathologiques qui peuvent renfermer d'autres microbes occasionne souvent des manifestations de septicémie qui tuent l'animal avant que l'on puisse obtenir des lésions tuberculeuses suffisantes.

L'inoculation sous-cutanée donne de bons résultats. L'inoculation intrapéritonéale vaut certainement mieux (Voy. p. 720). Toutefois certains produits, les crachats particulièrement, ne doivent pas généralement être injectés dans le péritoine ; ils détermineraient la plupart du temps une péritonite aiguë du fait d'autres microbes qu'ils contiennent.

Nattan-Larrier (1) recommande l'*inoculation dans la mamelle* d'une femelle de cobaye en pleine lactation, en faisant pénétrer l'aiguille près du mamelon, dans l'aréole. La sécrétion lactée diminue et change d'aspect. On constate aisément la présence de Bacilles dans le lait du cinquième au dixième jour, en faisant des préparations avec un peu de ce liquide que l'on fait sourdre par pression. La glande normale ne renfermerait jamais de Bacilles acido-résistants pouvant être une cause d'erreur.

Pour le beurre, on injecte dans le péritoine du cobaye 4 à 5 centimètres cubes du produit maintenu fondu à 37°. Dans ce cas particulier, à cause de la présence du beurre, on obtient des modifications assez spéciales, la formation d'un exsudat épais, une sorte de péritonite couenneuse. Il faut se rappeler que l'on a signalé dans le beurre la présence de Bacilles acido-résistants autres que le *Bacille de la tuberculose*, pouvant même produire chez le cobaye des symptômes similaires (Voy. p. 776).

Pour gagner du temps et ne pas attendre le moment assez éloigné de l'autopsie, on peut rechercher chez l'animal infecté la réaction de la tuberculine. Cette réaction se produit tôt, dès qu'il s'est fait une altération histologique, quelque minime qu'elle soit, déjà quarante heures après l'infection.

4° Recherche et diagnostic par l'emploi de la tuberculine.

Il peut être difficile de se procurer des produits pathologiques destinés à la recherche microscopique du *Bacille de la tuberculose* ou aux inoculations. D'un autre côté, les Bacilles eux-mêmes ne se rencontrent dans ces produits qu'à une certaine phase de la maladie ; on ne les trouve dans les crachats, par exemple, qu'après une fonte de tubercules dans la cavité bronchique. L'emploi de la tuberculine, qui détermine chez tout tuberculeux, même au début, une réaction si vive et bien caractéristique, permet d'obtenir des données des plus précieuses au point de vue du diagnostic.

Il faut cependant reconnaître que les épreuves à la tuberculine ne peuvent pas être regardées comme des procédés généraux courants de diagnostic, mais au contraire être réservées à des cas particuliers, douteux, où les moyens habituels, examen bactériologique, inoculation, signes cliniques, sont insuffisants ou ne donnent pas de résultats.

(1) Nattan-Larrier, Méthode de la mamelle (*Congrè de la tuberculose*, Paris, 1905, I, p. 380).

De plus, quelle que soit la méthode que l'on emploie pour obtenir une *réaction à la tuberculine*, il faut être prévenu qu'il y a parfois des insuccès ou des indications qui peuvent tromper.

Tout d'abord, la réaction peut manquer chez des sujets manifestement tuberculeux. C'est ce qui s'observe assez souvent chez les tuberculeux avancés où se rencontrent tous les autres signes entraînant certitude, dans la tuberculose miliaire aiguë, dans la méningite tuberculeuse, dans la tuberculose viscérale avec cachexie.

Par contre, elle est positive parfois chez des sujets qui ne présentent aucune manifestation de tuberculose, en apparence très sains, chez lesquels l'autopsie la plus minutieuse, ayant pu être pratiquée un certain nombre de fois, n'a permis de révéler aucune lésion, où la pulpe des organes a pu être inoculée aux cobayes sans résultats.

Une réaction positive se produit avec des lésions latentes ou des lésions excessivement minimes qui ne se seraient peut-être jamais manifestées, des lésions en voie de régression ou pouvant être considérées comme guéries. Ce qui peut alors induire facilement en erreur en faisant porter le diagnostic de tuberculose à propos d'une affection autre, simplement concomitante.

Enfin, une réaction positive peut s'obtenir dans d'autres conditions, tout à fait indépendantes de la tuberculose, qui ont pu déterminer dans l'organisme une sensibilité spéciale lui permettant de réagir. F. Arloing (1) a montré que plusieurs toxines microbiennes, les toxines typhique, diphtérique, staphylococcique, pouvaient développer chez des lapins indemnes de tuberculose l'aptitude à présenter certaines des réactions à la tuberculine, l'oculo-réaction notamment. Entz (2) a observé des mêmes faits chez l'homme avec les toxines diphtérique, typhique, paratyphique, pyocyanique, la toxine cholérique et celle du charbon symptomatique. Ces faits doivent faire mettre en doute, par conséquent, la spécificité réelle, absolue, des réactions à la tuberculine.

Emploi de la tuberculine chez l'homme. — *Inoculation sous-cutanée.* — C'est le procédé primitivement employé. Koch a signalé, dès 1890, l'action spéciale de la tuberculine, produisant, à doses minimes, d'un côté une réaction générale se traduisant par une élévation de température, d'un autre une action locale, congestive, sur les foyers tuberculeux.

L'homme tuberculeux est extrêmement sensible à la tuberculine (p. 715); cette sensibilité est encore exaltée chez les individus affaiblis et les enfants. A doses un peu fortes, quoique très minimes, la tuberculine peut occasionner une sorte de désagrégation des lésions tuberculeuses pouvant déterminer l'extension et même la généralisation d'un foyer (p. 715). Aussi ne faut-il jamais se départir de la plus grande prudence, si l'on se décide à recourir à ce procédé d'investigation; il est nécessaire de débuter par des doses excessivement minimes et tâter, en quelque sorte, la sensibilité du malade. *La dose de un centième de centimètre cube est une forte dose* pour un adulte tuberculeux; il vaut mieux commencer par des doses moindres, *de un à quelques millièmes de centimètre cube ou milligrammes* au début. Il va sans dire

(1) F. Arloing, Considérations sur le mécanisme et la valeur spécifique de l'oculo-réaction à la tuberculine (*Soc. de Biol.*, 1908, p. 722).

(2) Entz, *Wiener klin. Wochenschr.*, 1908, p. 379.

que les dilutions doivent alors être faites avec un *soin* extrême pour avoir une évaluation précise. La température doit être prise au mieux de deux heures en deux heures pendant les vingt-quatre heures qui précèdent et pendant les vingt-quatre heures qui suivent l'injection.

D'un autre côté, si l'on recourt à des injections à doses très faibles on risque de ne pas produire de réaction ou de n'en déterminer qu'une insuffisante. Si l'on vient alors à les répéter, à des doses croissantes, on peut produire de l'hypersensibilité et obtenir une réaction soi-disant spécifique chez des non-tuberculeux.

Hutinel (1) dit avoir obtenu d'excellents résultats de l'emploi de la tuberculine chez les enfants dans les cas où la clinique est impuissante à éclairer sur la nature de l'infection. Il débute par 1/20 ou 1/10 de milligramme suivant l'âge de l'enfant, en se servant de la solution suivante : tuberculine, 1 centimètre cube pour 1 000 centimètres cubes d'eau phéniquée à 1 p. 500. Il ne faut jamais injecter de tuberculine à un enfant qui a de la fièvre, le processus thermique observé pouvant être dû à la maladie. La réaction, très faible, n'occasionne que des troubles passagers. D'après Hutinel, tout enfant qui ne réagit pas à une injection de 1 milligramme de tuberculine doit être considéré comme indemne de tuberculose.

Grasset et Vedel (2) regardent la tuberculine comme un excellent moyen de diagnostic de la tuberculose chez l'homme. Ils ont employé dans leurs essais soit la tuberculine ordinaire, soit la tuberculine précipitée que livre l'Institut Pasteur.

Leur solution de tuberculine ordinaire est obtenue en mettant 1 gramme de tuberculine, diluée au dixième, dans 2000 centimètres cubes d'eau bouillie ; cette solution contient 2 dixièmes de milligramme de tuberculine par centimètre cube ; ils se sont servis de doses de 3 à 5 dixièmes de milligramme de tuberculine.

La tuberculine précipitée est dissoute à la dose de 50 milligrammes dans 5 centimètres cubes d'eau et glycérine à parties égales ; ils l'emploient à la dose de 1 à 2, rarement 3 décimilligrammes.

Les tuberculines, destinées aux cliniciens, doivent toujours être définies en activité avant leur emploi ; on le fait en les essayant sur des cobayes tuberculeux et déterminant la dose qui est pour eux rapidement mortelle (p. 716).

D'après les derniers auteurs, en s'en tenant à la marche indiquée, on n'observe jamais d'accidents à craindre et très peu de réaction locale, quelques symptômes généraux légers et insignifiants. Le sujet doit être apyrétique, mis au repos, et la température relevée toutes les trois ou quatre heures au moins, toutes les deux heures au mieux. Pour être considérée comme positive, l'élévation thermique doit dépasser 1 degré ; le maximum atteint ordinairement 1°,5 à 2 degrés, jusqu'à 3 degrés. La réaction commence de douze à vingt-quatre heures après l'injection et dure douze à quarante-huit heures, le maximum étant compris entre vingt et trente heures ; pour pouvoir la suivre commodé-

(1) Gaffié, Diagnostic de la T. pulmonaire infantile par les injections de tuberculine. Thèse de Paris, 1895.

(2) Grasset et Vedel, Du diagnostic de la T. humaine par les faibles doses de tuberculine (*Bull. de l'Acad. de méd.*, 25 février 1896, p. 174 ; *Congrès franç. de méd. int. de Lille*, 1899).

ment, il est donc préférable de faire l'injection le soir, vers 5 heures.

L'emploi de l'injection hypodermique de tuberculine chez l'homme (*sous-cuti-réaction*) comporte malgré tout des inconvénients sérieux, voire même des dangers lorsque la dose employée est un peu élevée. L'élévation thermique, qui peut être de 3 degrés, s'accompagne de phénomènes généraux, malaise, nausées, tachycardie, etc., qui peuvent persister plusieurs jours et sont souvent ennuyeux à subir. Aussi préfère-t-on s'adresser à des phénomènes d'action locale plus bénins et tout aussi nets à constater. On utilise surtout la cuti-réaction et l'oculo-réaction.

Cuti-réaction. — Koch avait signalé au début la production rapide d'une rougeur autour de la piqûre lors des injections de tuberculine ; Escherisch (1) avait donné au phénomène le nom de *Stich-reaktion* et Schick (2) eut plus tard l'idée de l'utiliser pour le diagnostic. Von Pirquet (3) a repris l'étude de l'action locale cutanée et a institué, sous le nom de *cuti-réaction* (*cutane-Impfung*), une méthode de diagnostic.

La technique à employer est la suivante : On dépose sur la peau, à la région deltoïdienne comme pour la vaccination habituelle, une goutte de tuberculine de Koch, pure ou diluée au quart dans la solution physiologique, puis dans la goutte, à l'aide d'une lancette ou d'un vaccinostyle, on pratique à la peau une petite scarification. On laisse le contact avec la tuberculine se faire pendant cinq minutes au moins. On peut également faire d'abord la scarification et déposer ensuite la goutte de tuberculine. Comme épreuve témoin, il est bon de faire, à un autre endroit un peu éloigné du premier, une autre scarification semblable, avec un autre instrument et sans user de tuberculine.

Dans le cas de réaction *positive*, il apparaît en six à quinze heures, entourant la scarification, une papule rougeâtre de 10 millimètres de large environ, pouvant atteindre jusqu'à 30 millimètres, à bords tantôt arrondis, tantôt sinueux, pouvant même envoyer des tractus ayant la direction des vaisseaux lymphatiques ; cette papule est entourée d'une zone érythémateuse plus ou moins étendue ; sur les bords, se développent parfois de petites vésicules. Le maximum de développement de la papule a lieu habituellement au bout de quarante-huit heures ; puis la coloration fonce, la papule s'affaisse, se dessèche et donne une légère croûtelle qui tombe après cinq à huit jours. La réaction obtenue est plus ou moins forte suivant les individus et, chez un même individu, suivant la quantité et l'activité de la tuberculine employée ; elle se mesure à la grandeur de la papule et à l'étendue de la zone érythémateuse.

Les symptômes observés sont des plus minimes. Il se produit, à l'endroit choisi, un peu de cuisson et de prurit ; on a cependant, dans quelques cas, remarqué une légère fièvre.

Lorsque la réaction est *négative*, il ne se forme aucune zone inflammatoire autour de la scarification qui forme rapidement une petite croûtelle tombant en trois à quatre jours.

(1) ESCHERISCH, Die Resultate des Koch'schen Injecktionen bei Scrophulose und Tuberkulose des Kindersalters (*Jahrb. für Kinderheilk.*, 1892, XXXIII, p. 369).

(2) SCHICK, *Jahrb. für Kinderheilk.*, 1905, LXI, p. 811.

(3) VON PIRQUET, Der diagnostische Wert der kutanen Tuberkulinreaktion bei der Tuberkulose des Kindersalters (*Wiener klin. Wochenschr.*, 1907, n° 38).

D'après les nombreuses observations faites, on peut conclure que la méthode donne surtout de bons résultats pour un diagnostic chez les enfants, et surtout les jeunes enfants de un à trois ans, à cause de la rareté de l'existence de foyers latents de tuberculose qui augmentent certainement avec l'âge. Von Pirquet n'a observé que 4 p. 100 de réaction positive chez des enfants de un à trois ans cliniquement indemnes de tuberculose, alors que la proportion s'élève jusqu'à 35 p. 100 chez des enfants de huit à quatorze ans se trouvant dans les mêmes conditions.

Chez les adultes, la cuti-réaction est plus souvent en défaut. Elle est beaucoup plus souvent positive chez des sujets non cliniquement tuberculeux, en raison de la fréquence des foyers latents d'abord, puis aussi de sensibilisations spéciales déterminées par d'autres toxines, enfin à cause de sa production possible dans des manifestations tout autres que la tuberculose, fièvre typhoïde, pneumonie, sclérose en plaques, hémiplégie. Enfin, d'après von Pirquet, certaines affections, la rougeole principalement, empêchent sa production.

Cette méthode ne peut donc pas donner une certitude absolue; elle a cependant une valeur diagnostique réelle, surtout dans les cas douteux, en faisant toutefois des réserves à son sujet.

Mantoux (1) a décrit sous le nom d'*intra-dermo-réaction* une méthode qui consiste à injecter la tuberculine dans l'épaisseur même du derme à l'aide d'une fine aiguille. Les phénomènes produits sont très semblables à ceux de la cuti-réaction et passibles des mêmes observations.

Oculo-réaction. — Wolf-Eisner (2) avait signalé, chez les bovidés tuberculeux, la production d'une réaction conjonctivale très nette au contact de la tuberculine avec la muqueuse oculaire. Calmette (3) a appliqué le fait au diagnostic de la tuberculose chez l'homme (*ophtalmo-diagnostic*). Il recommande d'user de tuberculine purifiée, précipitée par l'alcool à 95°, dissoute en proportion de 1 p. 100 dans l'eau stérilisée. On instille entre les paupières de l'un des yeux une goutte de cette solution. Dans le cas de réaction *positive*, il apparaît, déjà après six heures, une rougeur lie de vin très caractéristique de la caroncule conjonctivale et une faible exsudation séro-fibrineuse riche en lymphocytes. Ce peut être tout; la rougeur persiste un ou deux jours, puis disparaît graduellement: la réaction est légère. La réaction peut être plus intense; l'œil est congestionné, peut même être complètement fermé par un fort gonflement; la sécrétion est abondante, parfois même purulente. L'inflammation produite peut même être grave; on a observé des conjonctivites et des kératites prolongées. D'après de Lapersonne, de tels accidents ne surviendraient que lorsque l'œil est déjà malade antérieurement; aussi ne doit-on employer la méthode que lorsque l'œil est absolument sain, ce qui est parfois assez difficile à juger.

Outre cela, la méthode est passible des mêmes critiques que toutes

(1) Mantoux, Intra-dermo-réaction à la tuberculine (*C. R. de l'Acad. des sc.*, 1908, CXLVII, p. 355).

(2) Wolf-Eisner, *Berlin. klin. Wochenschr.*, 1907, n° 22.

(3) Calmette, Breton, Painblan et Petit, Utilisation pratique de l'ophtalmo-réaction pour le diagnostic de la tuberculose chez l'homme (*Presse médicale*, 1907, n° 56).

celles qui comportent l'emploi de la tuberculine. D'après Petit (1), la réaction serait positive dans 92,32 p. 100 des cas de tuberculose. Elle manque chez des tuberculeux avancés. Elle a fait défaut dans quelques cas de pleurésie, péritonite ou méningite tuberculeuses. Elle est positive dans 18,43 p. 100 des cas de non cliniquement tuberculeux. Beaucoup de cas positifs sont dus certainement à la présence de foyers latents, enkystés ou guéris. On a signalé des réactions positives dans le diabète, la syphilis, la fièvre typhoïde, la fièvre méditerranéenne, la sporotrichose, le rhumatisme articulaire aigu, la carcinose généralisée, la lèpre, la cirrhose atrophique, l'ictère. Ce sont des défauts de la méthode dont il faut tenir sérieusement compte lorsqu'on l'utilise.

D'autres réactions locales peuvent être produites par des moyens différents, soit sur la peau, soit sur des muqueuses, et permettent d'obtenir des indications toutes semblables à celles que fournissent la cuti-réaction et l'oculo-réaction. Moro (2) conseille de frictionner la peau pendant une minute avec un peu de pommade composée à parties égales de tuberculine et de lanoline. Lignières (3) frotte la peau rasée et lavée à l'alcool avec un peu de tuberculine pure. Lautier (4) maintient sur la peau pendant vingt-quatre heures, à l'aide d'une bande de diachylon, une boulette de coton imbibée d'une solution à 1 p. 100 de tuberculine purifiée. Dans le cas de réaction positive, il apparaît des rougeurs et même de petites éruptions vésiculaires à la place qui a eu le contact du réactif. Laffite-Dupont et Molinier (5) mettent la tuberculine en contact avec la muqueuse nasale (*rhino-réaction*), Richter (6) avec la muqueuse vaginale qui réagissent dans le même sens que la conjonctive dans les cas positifs. Les résultats obtenus à l'aide de toutes ces dernières méthodes sont moins bien établis que ceux fournis par les précédentes.

Leuco-réaction. — Toutes les épreuves à la tuberculine dont il vient d'être parlé se passent *in vivo* en produisant des phénomènes généraux dont le principal est l'élévation de température et des phénomènes locaux consistant surtout en un afflux de leucocytes au point qui a le contact de la tuberculine. Achard et Bénard (7) ont remarqué que les leucocytes des tuberculeux étaient particulièrement sensibles à l'excitation produite par la tuberculine. D'où l'idée de rechercher dans les différences d'activité des leucocytes des indications pour le diagnostic de tuberculose. Pour mesurer cette activité, les auteurs cités apprécient le pouvoir phagocytaire des leucocytes à l'égard de levures stérilisées, d'éléments de muguet. L'activité leucocytaire d'un sujet tuberculeux,

(1) Petit, Le diagnostic de la tuberculose par l'ophtalmo-réaction. Paris, Masson, 1907.

(2) Moro, Ueber eine diagnostisch verwertbare Reaktion der Haut auf Einreibung mit Tuberkulinsalbe (*Munch. med. Wochenschr.*, 1908, n° 5, p. 216).

(3) Lignières, Sur un nouveau mode de réaction de la peau à la tuberculine et son utilisation dans le diagnostic de la tuberculose (*C. R. de l'Acad. des sc.*, 1908, CXLV, p. 727).

(4) Lautier, *Soc. de Biol.*, 1908, n° 3, p. 91.

(5) Laffite-Dupont et Molinier, Réaction de la muqueuse nasale à la tuberculine. Rhino-réaction (*Soc. de Biol.*, 1908, I, p. 702).

(6) Richter, Ueber Ophtalmo-, Kutan-, und Vaginal-reaktion bei Tuberkulose (*Zeitschr. für Infektionskrankh. und Hyg. der Hausthiere*, 1908, V, n°s 3 et 4).

(7) Achard et Bénard, Réactions spécifiques des leucocytes. Leuco-diagnostic (*Soc. de Biol.*, 13 nov. 1909, p. 502).

mesurée dans de la solution physiologique additionnée de tuberculine, puis dans ce même liquide seul, montre une différence en faveur du premier milieu. Cette *leuco-réaction* aurait donné des résultats positifs alors que la cuti-réaction avait échoué.

Le très grand avantage est d'opérer tout à fait hors de l'organisme, sans comporter d'ennui ou de dérangement autre que la prise des quelques gouttes de sang nécessaires, et de ne rien faire voir au malade, grave objection à faire aux méthodes précédentes. Pour juger de la valeur de la réaction, il faut avoir des données plus complètes.

Les exsudats des phtisiques contiennent de la tuberculine identique à celle des cultures, mais en proportion assez faible. En injectant à des tuberculeux du liquide d'ascite tuberculeuse à la dose de 5 à 10 centimètres cubes, Debove et Rémond ont observé la production de la réaction fébrile caractéristique. Debove et Renault ont même proposé d'utiliser cette constatation comme moyen de diagnostic dans les cas douteux, en inoculant de tels exsudats à des cobayes tuberculeux (1).

Salter (2) a obtenu presque constamment la réaction typique sur des cobayes tuberculeux par inoculation de sueur de phtisiques. Rappin et Fortineau (3) l'ont obtenue, mais d'une façon très inconstante, avec l'urine des tuberculeux.

Emploi de la tuberculine chez les animaux. — C'est surtout pour le *diagnostic précoce* de la tuberculose des bovidés que l'emploi de la tuberculine est précieux. D'après ce que l'on sait de la fréquence de la tuberculose chez ces animaux, de l'extension rapide de la contagion chez eux et du danger possible de sa transmission à l'homme par la viande et le lait des animaux tuberculeux, on conçoit la haute importance d'établir tôt et d'une façon sûre ce diagnostic. C'est un élément de prophylaxie de l'infection tuberculeuse humaine. Le diagnostic de la tuberculose au début est particulièrement difficile chez l'animal, qui ne permet pas souvent l'auscultation fine et délicate. D'un autre côté, il est souvent difficile de se procurer des produits à examiner. Les animaux ne crachent pas ; on peut bien, suivant le conseil de Nocard, racler la muqueuse de la gorge avec une baguette et examiner le mucus obtenu. Le moyen suivant, que préconise Puech (4), est souvent plus aisé à appliquer : On met un séton à la nuque de la bête soupçonnée et l'on examine le pus suivant les méthodes ordinaires ; il renferme souvent des Bacilles tuberculeux du huitième au quatorzième jour.

L'emploi de la tuberculine est bien plus sûr et beaucoup plus facile : il est devenu une pratique courante, surtout à la suite de la vaillante propagande de Nocard (5).

L'injection d'une assez forte dose, 30 à 40 centigrammes, suivant la taille de l'animal, détermine chez les tuberculeux une forte réaction

(1) Debove et Renault, *Soc. méd. des hôp.*, 1891.

(2) Salter, *The Lancet*, 15 janvier 1898, p. 152.

(3) Rappin et Fortineau, Recherche de la réaction de la tuberculine dans l'urine des tuberculeux (*Assoc. franç. pour l'avancement des sc.*, septembre 1899).

(4) Puech, *C. R. de l'Acad. des sc.*, CVIII, 1889, p. 193.

(5) Nocard, Applications de la tuberculine au diagnostic de la tuberculose bovine (*Ann. de l'Inst. Pasteur*, 1892).

fébrile, avec élévation de température de 1°,5 à 3 degrés. Chez l'animal non tuberculeux, cette même quantité ne produit aucun effet.

La réaction fébrile apparaît le plus souvent de douze à quinze heures après l'injection, quelquefois dès la neuvième heure, très rarement après la dix-huitième ; elle dure toujours plusieurs heures et retombe d'ordinaire à la normale de la vingt-quatrième à la quarantième heure. La durée et l'intensité de la réaction ne sont pas en rapport avec les lésions (1).

La technique de l'opération est des plus simple.

On se sert d'une dilution au dixième de tuberculine dans l'eau phéniquée à 5 p. 1000, préparée avec de l'eau récemment bouillie :

Tuberculine brute............................	1 centimètre cube.
Eau phéniquée à 5 p. 1 000...................	9 centimètres cubes.

Cette tuberculine diluée est d'une conservation limitée ; il est nécessaire de ne pas la conserver plus d'une quinzaine de jours à l'obscurité dans des flacons bien bouchés. La tuberculine brute se conserve très longtemps dans ces conditions ; il vaut mieux ne préparer la dilution qu'au moment du besoin.

Il est à recommander de prendre une ou plusieurs températures la veille et le jour même, avant l'opération, pour ajourner les individus qui pourraient être sous une influence pathologique autre.

Il vaut mieux faire l'opération le soir vers 9 ou 10 heures ; on dispose ainsi de toute la journée du lendemain pour suivre les températures.

L'injection se fait de préférence sous la peau, en arrière de l'épaule, avec les précautions antiseptiques habituelles. Les proportions de liquide à injecter varient avec la force de l'animal ; pour une petite bête, injecter 3 centimètres cubes de la dilution au dixième ; 3 centimètres cubes et demi pour une vache de grande taille ; 4 centimètres cubes pour un fort bœuf ou taureau. Pour les veaux, la dose varie entre 1 et 2 centimètres cubes.

Il faut prendre la température toutes les deux heures, de la douzième à la vingtième heure ou au moins trois fois dans cet intervalle. Toute bête qui présente une réaction supérieure à 1°,4 doit être considérée comme tuberculeuse ; une élévation de température inférieure à 0°,8 n'a aucune signification ; les bêtes dont la réaction est comprise entre 0°,8 et 1°,4 doivent être regardées comme suspectes et soumises, un mois après, à une nouvelle injection de tuberculine à dose plus forte que celle employée en premier lieu. Chez les veaux jusqu'à six mois, une élévation de 0°,5 doit toujours être considérée comme suspecte.

Pour empêcher la réaction de la tuberculine de se produire, on a mis à profit l'accoutumance facile de l'organisme au produit, en faisant à la bête une injection de tuberculine la veille ou l'avant-veille de l'opération de contrôle. Dans les cas où cette manœuvre pourrait être suspectée, il faut séquestrer l'animal et faire une nouvelle injection après un temps suffisant, un mois environ, pour que l'effet des inoculations

(1) Nocard et Leclainche, *Les maladies microbiennes des animaux*.

précédentes soit tout à fait épuisé ; ou bien, comme l'indique Vallée (1), injecter des doses doubles de tuberculine.

Les animaux sains supportent sans réagir des doses beaucoup plus fortes.

L'expérience démontre que ces injections de tuberculine n'ont aucun effet fâcheux sur la qualité du lait ou de la viande. La sécrétion lactée diminue d'abord un peu avec la montée de température, puis se rétablit vers le troisième jour (2).

L'emploi de la tuberculine comporte, ici aussi, des défaillances. Les tuberculeux très avancés, surtout ceux en pleine période fébrile, peuvent ne réagir que très peu ou même pas du tout ; leur organisme est comme imprégné de tuberculine qu'il fabrique. Mais alors, toujours ici les signes cliniques ne peuvent permettre le moindre doute. La réaction peut s'obtenir alors que l'animal ne présente plus que des foyers éteints. On l'a enfin obtenue chez des animaux atteints d'autres lésions que la tuberculose, distomatose, échinococcose par exemple.

On peut tout aussi bien se servir de l'inoculation à la tuberculine pour établir le diagnostic de la tuberculose chez les autres animaux domestiques. Les doses doivent nécessairement varier avec la taille de l'animal. Chez le cheval, on peut injecter 3 ou 4 centimètres cubes de la dilution au dixième ; chez le mouton et la chèvre, de 1/2 à 1 centimètre cube ; chez le porc, de 1 à 2 centimètres cubes ; chez le chien et le chat, de 1/2 à 1 centimètre cube, mais, chez eux, les résultats paraissent assez peu sûrs (3).

Les réactions locales étudiées chez l'homme peuvent avoir aussi chez les animaux d'utiles applications. La *cuti-réaction* donne des résultats bien nets chez les bovidés et les chevaux, peut-être même plus nets que chez l'homme d'après Vallée (4) et Moussu (5). La recherche est cependant délicate, à cause de l'épaisseur de la peau ; il faut faire la scarification assez profonde. La réaction apparaît vers la trente-sixième heure et persiste de huit à quinze jours. Des animaux tuberculeux, surtout à lésions graves et étendues, ne donnent pas la réaction. Moussu signale sa production dans l'actinomycose. D'après Moussu et Mantoux (6), l'intra-dermo-réaction serait de beaucoup à préférer en injectant de un dixième à un cinquième de centimètre cube de tuberculine brute diluée au dixième, choisissant de préférence un des plis cutanés qui vont de la base de la queue à la marge de l'anus. Lignières a préconisé l'emploi direct de la tuberculine sur la peau rasée, Richter sur la muqueuse vaginale (p. 765). Vallée recommande l'*oculo-réaction*, de tech-

(1) Vallée, Sur l'accoutumance à la tuberculine (*Ann. de l'Inst. Pasteur*, XVIII, 1904, p. 545).

(2) Tiraboschi, Influence de la tuberculination sur la sécrétion lactée (*Hygiène de la viande et du lait*, février 1908).

(3) Roussel, La tuberculose des petits animaux et les défaillances de la tuberculine (*Bull. de la Soc. de méd. vétér.*, 6 mai 1909, p. 179).

(4) Vallée, Sur un nouveau procédé de diagnostic expérimental de la tuberculose et de la morve (*Bull. de la Soc. de méd. vétér.*, 1907, p. 308). — Sur la cuti-réaction à la tuberculine (*Soc. de Biol.*, 1907).

(5) Moussu, Sur la cuti-réaction à la tuberculine (*Recueil de méd. vétér.*, 1907, p. 273).

(6) Moussu et Mantoux, Sur l'intra-dermo-réaction à la tuberculine chez les animaux (*Recueil de méd. vétér.*, 1908, nos 20 et 24).

nique plus commode et plus simple. Pour ces différentes méthodes, les mêmes observations sont à faire que chez l'homme au point de vue des résultats positifs ou négatifs obtenus.

5° Agglutination et séro-diagnostic.

L'étude du pouvoir agglutinant du sérum des tuberculeux nécessitait l'usage de milieux liquides où les Bacilles se trouvaient à peu près également et uniformément répartis dans la masse.

Arloing (1) a pu obtenir, à la suite de manipulations spéciales, principalement l'agitation fréquente, des cultures en bouillon glycériné où les Bacilles ne se réunissaient plus en voile à la surface, comme c'est le cas habituel, mais se répandaient uniformément dans le liquide, formant une émulsion homogène ; ce sont les *cultures homogènes*.

On les prépare comme il suit. On part de cultures sur pommes de terre glycérinées, préparées comme il a été dit page 700, avec un excès de liquide. Les cultures qui paraissent donner le meilleur résultat sont celles à aspect gras, et il vaut mieux prendre pour l'ensemencement les colonies qui se développent au contact du liquide. La culture s'étend alors facilement en voile sur le liquide en excès. On remue tous les jours pour habituer au contact du liquide. L'agitation dissocie les Bacilles et, au bout de quelques semaines, l'eau glycérinée forme une véritable émulsion de Bacilles. Avec cette émulsion, on ensemence du bouillon de bœuf peptonisé à 1 p. 100 et glycériné à 6 p. 100, réparti dans des matras cylindriques à fond plat, que l'on met à l'étuve à 38° et que l'on agite tous les jours et même plusieurs fois par jour. Le bouillon reste limpide pendant trois ou quatre jours, puis il apparaît une légère végétation au fond du vase ; bientôt le liquide se trouble dans toute sa masse.

Buard (2) dit qu'il est préférable, pour obtenir ces cultures homogènes, de partir des cultures sur carottes glycérinées, qui permettraient d'arriver plus vite au résultat cherché, en opérant, du reste, de la même façon.

De telles cultures sont nettement agglutinées par le sérum d'individus tuberculeux ou par celui d'animaux qui ont reçu des inoculations sous-cutanées de tuberculine ou d'émulsion de Bacilles tuberculeux.

Les cultures de huit à douze jours sont les plus favorables pour la réaction ; au delà, l'agglutination est moins nette.

Ces cultures homogènes se reproduisent facilement, et même de mieux en mieux, semble-t-il, comme si le microbe s'habituait à ces conditions. La semence destinée à de nouvelles cultures doit être prise de préférence dans la partie supérieure des cultures développées ; c'est là où l'on trouve le moins d'amas microbiens. Pour maintenir l'homogénéité, il faut continuer d'agiter, sans quoi le liquide s'éclaircit, il se fait un dépôt cohérent qui ne s'émulsionne plus bien et même parfois un voile à la surface.

(1) Arloing, Sur l'obtention de cultures homogènes du Bacille de la tuberculose (*C. R. de l'Acad. des sc.*, 9 mai 1898). — Agglutination du Bacille de la tuberculose vraie (*Ibid.*, 16 mai 1898, et *Congrès de médecine de Montpellier*, 1898). — Arloing et P. Courmont, De l'obtention des cultures du Bacille de Koch les plus propices à l'étude du phénomène de l'agglutination par le sérum sanguin des tuberculeux (*C. R. de l'Acad. des sc.*, 8 août 1898, p. 312).

(2) Buard, De la séro-réaction tuberculeuse. Thèse de Bordeaux, 1900.

Dans ces bouillons homogènes, on trouve des Bacilles isolés, paraissant légèrement mobiles, et quelques petits amas de 3, 4, 5 et exceptionnellement 6 bâtonnets

La recherche de l'agglutination se fait de la façon suivante. Arloing et P. Courmont (1) conseillent de faire trois mélanges de sérum et de culture aux taux de 1/5, 1/10 et 1/20. On prend trois petits tubes stérilisés dans lesquels on verse 5,10 et 20 gouttes de culture. Dans chacun des tubes, on verse une goutte du sérum à examiner. Buard préfère verser dans chacun des trois tubes 15 gouttes de la culture et ajouter respectivement 3 gouttes, 2 gouttes, 1 goutte de sérum. Il est inutile de recourir à des proportions plus fortes de sérum ; avec plus de 1 p. 5, l'agglutination est fréquente en dehors de tout soupçon de tuberculose et n'a conséquemment plus de valeur. D'un autre côté, elle fait d'ordinaire défaut au-dessous de 1 p. 20, quoiqu'on puisse encore l'observer à 1 p. 40 et même 1 p. 50. Il est bon de préparer un tube témoin, avec la culture seule ; la comparaison permet de mieux juger des modifications qui peuvent se produire. Les tubes sont disposés inclinés et laissés en repos pendant trois à quatre heures d'après Buard, cinq à six heures d'après Courmont. Le temps dépend de la culture employée ; des essais avec un sérum étalon font reconnaître la durée la meilleure. Avec un contact prolongé, de vingt à vingt-quatre heures, on ne doit plus rien tirer de la réaction, tout sérum pouvant produire l'agglutination après une telle durée. La clarification du liquide est plus ou moins complète suivant l'intensité de la réaction. Lorsque la réaction est minime, la paroi des tubes est comme finement striée de petits points ; dans les cas bien nets, les grumeaux sont assez gros et se sédimentent déjà en partie. Toutefois, au simple examen à l'œil, l'éclaircissement peut être très faible, le dépôt très minime.

Il est nécessaire de recourir à l'examen microscopique. On agite légèrement les tubes, en commençant par la dilution la plus riche en sérum ; on en prélève une goutte avec une anse de platine et l'on monte en préparation qu'on lute à la paraffine. On procède de même avec le tube témoin.

Il faut distinguer les faux amas, où les Bacilles sont en nombre restreint, 3, 4, 5, jamais plus de 6, peu serrés, simplement accolés, et les amas véritables, où les Bacilles sont en grand nombre, très serrés, comme entassés. D'ordinaire, la dilution la moins riche en sérum peut contenir moins de vrais amas ; les deux autres ont le plus souvent le même aspect. Il reste toujours des Bacilles libres dans le liquide.

On peut aussi faire la séro-réaction extemporanée en mélangeant sur la lamelle une goutte de culture et une goutte de sérum ; l'épreuve est toutefois moins nette.

On peut aussi se servir de sang desséché sur du papier ou de la toile, de préférence stérilisés, que l'on reprend par un peu d'eau distillée. Il faut alors tenir compte approximativement de la dilution pratiquée.

En ajoutant aux cultures homogènes d'âge convenable 1 p. 400 de formol, ou en les plaçant dans une glacière (2), on peut conserver des

(1) Arloing et P. Courmont, Sur la recherche et la valeur clinique de l'agglutination du Bacille de Koch par le sérum sanguin de l'homme (*C. R. de l'Acad. des sc.*, CXXVII, 1898, p. 425).

(2) Arloing et P. Courmont, De l'action du froid et des antiseptiques sur la conservation des cultures homogènes de Bacilles tuberculeux destinées à l'agglutination (*Soc. de Biol.*, 14 décembre 1901).

cultures aptes à servir pendant une quinzaine de jours. Il faut fortement les agiter au moment d'en faire usage.

Dans les essais d'Arloing et P. Courmont, le sang d'individus tuberculeux a donné des résultats positifs dans la proportion de 92 p. 100 ; Bendix (1), Buard, Rumpf et Guinard (2), entre autres, disent aussi avoir obtenu de bons résultats de la méthode. D'autres, par contre, Beck et Rabinowitch (3) principalement, ne reconnaissent pas à la réaction une précision suffisante pour l'employer avec fruit. Alvarez (4) a trouvé souvent la méthode en défaut chez les malades atteints de lupus vulgaire, d'origine bien nettement tuberculeuse.

On a signalé à diverses reprises le fait que le sérum des tuberculeux avancés ne produisait pas d'agglutination.

Les sérosités tuberculeuses produisent aussi l'agglutination aux doses de 1 p. 5 à 1 p. 20. Cette propriété paraît être plus irrégulière. Le liquide pleurétique agglutinerait souvent moins bien que le sérum sanguin, d'autres fois plus. Courmont (5) dit que l'agglutination se produit presque toujours à 1 p. 10 pour tous les épanchements tuberculeux.

Le sang des animaux inoculés avec le Bacille de Koch montre des propriétés agglutinantes très nettes.

Arloing (6) dit avoir constaté que le sang de chèvre pouvait acquérir des propriétés agglutinantes sous l'influence d'injections sous-cutanées répétées de liqueur de Miahle, d'eucalyptol, de gaïacol ; ce qui prouve que certaines substances chimiques peuvent faire apparaître la propriété agglutinante dans le sérum tout comme des produits spécifiques.

D'après Oraglia (7), le sérum de beaucoup d'animaux sûrement indemnes de tuberculose peut agglutiner les cultures homogènes. Dans beaucoup de maladies, en outre, le sérum agglutinerait autant ou même plus que le sérum tuberculeux.

Romberg (8) remplace les cultures homogènes par des émulsions de Bacilles broyés. Koch (9) broie les cultures desséchées, centrifuge pour séparer les parties lourdes et met en émulsion dans de la solution physiologique phéniquée. Le liquide opalescent peut se conserver quinze

(1) Bendix, Zur Serodiagnose der Tuberkulose (*Deutsche med. Wochenschr.*, 1900, n° 14, p. 224).

(2) Rumpf et Guinard, Ueber die Agglutination der Tuberkelbacillen und die Verwerthung dieser Agglutination (*Deutsche med. Wochenschr.*, 20 février 1902, p. 131).

(3) Beck et Rabinowitch, Ueber den Werth der Courmont'schen Serumreaction für die Frühdiagnose der Tuberkulose (*Deutsche med. Wochenschr.*, 1900, p. 400).

(4) Alvarez, Agglutinaçao do Bacillo do Koch nos luposus, Lisbonne, 1905.

(5) P. Courmont, Action des épanchements des sérums, tuberculeux ou non, sur les cultures de Bacilles de Koch en milieux liquides (*Soc. de Biol.*, 28 mai 1898). — Sérodiagnostic des épanchements tuberculeux (*Congrès de la tuberculose*, 1898). — L'agglutination du Bacille de Koch par les épanchements tuberculeux (*Arch. de méd. expér.*, XII, 1900, p. 697).

(6) Arloing, Apparition dans le sérum sanguin, sous l'influence de produits chimiques, d'une matière capable d'agglutiner le Bacille de la tuberculose vraie (*C. R. de l'Acad. des sc.*, CXXVI, 1898).

(7) Oraglia, *Gazzetta degli Osped.*, 8 septembre 1901.

(8) Romberg, Zur Serumdiagnose der Tuberkulose (*Deutsche med. Wochenschr.*, 1901, n°s 18 et 195). — Weitere Mittheilungen zur Serumdiagnose der Tuberkulose (*Munch. med. Wochenschr.*, 1902, n° 3).

(9) Koch, Ueber die Agglutination der Tuberkelbacillen und über die Verwerthung dieser Agglutination (*Deutsche med. Wochenschr.*, 28 novembre 1901, p. 829).

jours dans la glacière. L'agglutination se produit en quinze à vingt heures avec le sérum tuberculeux. Les résultats ne sont pas préférables à ceux que peut fournir le procédé Arloing-Courmont.

En somme, dans cette question du séro-diagnostic de la tuberculose, il faut encore faire de grandes réserves.

L'absence d'agglutination permet d'écarter le diagnostic de tuberculose, mais encore pas d'une façon absolue (p. 771) ; une agglutination bien positive peut être difficile à interpréter au point de vue clinique, en raison surtout des foyers latents ou cliniquement éteints qui peuvent être la cause de la réaction observée, puis de la possibilité de sa production dans certaines autres infections, pneumonie, infections à streptocoques, fièvre typhoïde par exemple, dans certaines ictères également.

6° Précipito-réaction.

Bonome (1) a cherché à appliquer la réaction de précipitation au diagnostic de la tuberculose. Il emploie comme substance précipitable une émulsion d'organes d'animaux ou d'hommes tuberculeux. Du foie, de la rate tuberculeux sont finement broyés avec du sable et émulsionnés avec de l'eau glycérinée à 5 p. 100, en proportion de 3 à 4 centimètres cubes de bouillie pour 12 à 14 centimètres cubes d'eau glycérinée ; le mélange est souvent agité pendant deux heures, puis le liquide est centrifugé et filtré sur papier.

L'addition à une petite quantité de ce liquide très clair, 2 centimètres cubes par exemple, d'une goutte de sérum d'homme ou d'animaux tuberculeux, détermine en une douzaine d'heures la formation d'un précipité floconneux, indiquant la présence dans le sérum d'une précipitine tuberculeuse. Bonome prétendait même qu'on pouvait distinguer le Bacille bovin du Bacille humain en employant un liquide de provenance correspondante.

Cette réaction s'est montrée très sujette à caution. D'après Stœrk (2), on ne l'obtient pas chez les lupiques. Bezançon et de Serbonnes (3) l'ont trouvée très irrégulière chez les tuberculeux, constante et très intense chez les typhiques et les pneumoniques ; ils concluent qu'on ne doit lui attribuer aucune valeur.

Vincent et Combes (4) utilisent comme précipitine le liquide céphalo-rachidien et la tuberculine comme substance précipitable. Une goutte de tuberculine est mélangée à 100 gouttes du liquide céphalo-rachidien de l'individu suspect ; on met à l'étuve à 37°. Le précipité doit apparaître entre dix et douze heures. La réaction s'est montrée positive chez les typhiques et les syphilitiques.

Jousset (5) cherche à déceler la tuberculine dans le sang ou les

(1) Bonome, Praezipitin-Reaktion als diagnostisches Mittel der Tuberkulose und zur Differenzierung zwischen Menschen und Rindertuberkulose (*Centralbl. für Bakt.*, 1 Abth., Originale, 1907, XLIII, p. 391).

(2) Stœrk, *Wiener klin. Wochenschr.*, 1908, XXI, p. 282 et 364 ; 1909, XXII, p. 808.

(3) Bezançon et de Serbonnes, *Journ. de physiol.*, décembre 1909 et janvier 1910.

(4) Vincent et Combes, *Soc. de Biol.*, 18 décembre 1909.

(5) Jousset, *Soc. de Biol.*, 11 novembre 1909.

humeurs avec du sérum précipitant de lapin, de chèvre ou d'âne inoculés avec du Bacille humain. La précipitation est aussi irrégulière.

7° Réaction de fixation du complément.

Widal et Le Sourd (1) ont voulu appliquer la réaction de Bordet et Gengou au diagnostic de la tuberculose. En raison de la spécificité de la réaction, on pouvait beaucoup espérer des résultats. Les nombreuses recherches faites sont malheureusement contradictoires. Alors que Widal et Le Sourd, Camus et Pagniez (2), Armand Delille (3) obtiennent un pourcentage élevé de réaction positive chez les tuberculeux, Wassermann et Brücke (4), Lüdke (5), Cohn (6), Hanns (7), Bezançon et De Serbonnes (8) la trouvent très irrégulière, manquant chez des tuberculeux notoires, même chez des animaux expérimentalement tuberculisés. Les renseignements cliniques que l'on peut en tirer doivent donc être regardés comme insuffisants et sujets à caution.

Comme système hémolytique, on se sert de sérum de lapin préparé aux globules rouges de mouton (p. 415), chauffé à 56° comme il a été dit, et additionné de globules rouges de mouton. On prend une émulsion à 5 p. 100 de ces globules dans l'eau physiologique ; Bezançon et de Serbonnes disent qu'il est beaucoup plus sûr de prendre une petite quantité d'hématies non diluées.

On doit se servir comme antigène d'une émulsion bien homogène obtenue avec une culture récente de Bacille tuberculeux sur pomme de terre. Il faut éviter de se servir de tuberculine, qui possède une action anti-hémolytique réelle et peut contrarier la réaction.

Le sérum à examiner, supposé contenant une sensibilisatrice tuberculeuse, est recueilli par piqûre du doigt ou tout autre procédé pouvant fournir au moins 1 centimètre cube de sang. Ce sérum est chauffé à 56° pendant une demi-heure pour détruire son complément. Il est nécessaire de vérifier au préalable, après le chauffage, son action sur les globules rouges qu'il hémolyse parfois seul, sans addition de complément. De plus, d'après Bezançon et de Serbonnes, le sang doit toujours être pris avant le repas.

Le sérum à complément est du sérum normal de cobaye (p. 416).

Dans une série de petits tubes, cinq ou six par exemple, contenant chacun deux gouttes du sérum à étudier, on met pour chacun deux gouttes de l'émulsion bacillaire et on ajoute deux gouttes du sérum normal de cobaye. On laisse à l'étuve à 37° pendant deux heures en

(1) Widal et Le Sourd, Existence d'une sensibilisatrice dans le sérum des tuberculeux (*Soc. méd. des hôp.*, 5 juillet 1901).

(2) Camus et Pagniez, *Soc. de Biol.*, 6 juillet 1901.

(3) Armand Delille, Déviation du complément à la tuberculine et cuti-réaction (*Soc. de Biol.*, 1er mai 1909).

(4) Wassermann et Brucke, Experimentelle Studien über die Wirkung von Tuberkelbacillenpräparate auf tuberkulöserkranken Organismus (*Deutsche med. Wochenschr.*, 1906, p. 448).

(5) Ludk *Beitr. zur klin der Tuberkulose*, I, 1907.

(6) Cohn, Ueber die durch Komplementbindung nachweisbaren Tuberkulose-antikörper im Blut von Phtisikern (*Beitr. zur klin. der Tuberkulose*, 1909).

(7) Hanns, Réaction de fixation dans la tuberculose. Thèses de Nancy, 1909.

(8) Bezançon et de Serbonnes, *Soc. de Biol.*, novembre 1909.

agitant de temps en temps. Puis on introduit dans chaque tube une petite quantité de globules rouges de mouton, une goutte d'une émulsion à 5 p. 100 dans la solution physiologique ou très peu du dépôt d'hématies non diluées. Si le sérum à examiner renferme un anticorps tuberculeux, une sensibilisatrice, l'hémolyse ne se fait pas, le complément du sérum de cobaye s'étant fixé sur les Bacilles tuberculeux : le liquide restera incolore les globules rouges se sédimenteront graduellement.

Si, au contraire, ce sérum ne renferme pas de sensibilisatrice tuberculeuse, le complément non fixé restera libre dans le mélange et activera le sérum hémolytique ; l'hémolyse se fera rapidement, les globules entreront en dissolution et teindront le liquide en rouge.

En outre des défaillances signalées, la méthode, on le voit, est délicate à appliquer et comporte des manipulations quelque peu compliquées pour pouvoir passer dans la pratique courante.

Marmorek (1) a imaginé une variante dans l'application de la réaction de Bordet et Gengou au diagnostic de la tuberculose. D'après lui, le sérum et l'urine des tuberculeux renfermeraient la véritable toxine tuberculeuse et pourraient être pris comme antigènes. L'anticorps serait son sérum antituberculeux simple préparé sans association de Streptocoque. Il mélange dans chaque tube 3 gouttes de sérum ou 4 gouttes d'urine de l'individu suspect, 6 gouttes de sérum antituberculeux et 1 goutte de sérum de cobaye normal, met une heure à l'étuve, puis ajoute le système hémolytique inactivé. L'hémolyse ne se produit pas s'il existe une sensibilisatrice tuberculeuse dans le sérum ou l'urine : elle s'observe dans le cas contraire. On peut faire à cette méthode les mêmes objections générales qu'aux précédentes ; Bergeron (2) dit cependant ne l'avoir trouvée en défaut chez les tuberculeux qu'en proportion de 1,22 p. 100.

8° Recherche de l'indice opsonique.

Wright a proposé de déterminer l'indice opsonique du sang des sujets suspects de tuberculose ou tuberculeux et de le comparer avec celui des sujets sains. La technique à suivre est celle qui a été indiquée page 411 et suivantes. D'après Wright, chez les tuberculeux l'indice opsonique est ordinairement inférieur à 0,3, alors que chez les individus sains il est compris entre 0,8 et 1,2. Chez un même sujet, les variations qu'il présente donnent d'assez bonnes indications sur l'état de défense de l'organisme et de résistance à l'infection; un indice opsonique bas indique une résistance faible, tandis qu'un indice qui va en croissant dénote que la résistance augmente progressivement.

La méthode est d'ailleurs d'un emploi délicat et d'une interprétation réellement difficile. D'après Milhit (3), des maladies aiguës autres que la tuberculose font varier le pouvoir opsonique du sang à l'égard du Bacille de la tuberculose : la coqueluche, la rougeole, la varicelle, la

(1) Marmorek. *Presse médicale*, 6 janvier 1909.
(2) Bergeron. *Presse médicale*, 1er janvier 1910.
(3) Milhit, Les opsonines. Thèses de Paris, 1909.

scarlatine l'abaissent : la fièvre typhoïde l'élève ; ce sont là des causes d'erreur importantes.

9° Cyto-diagnostic.

D'après Widal et Ravaut (1), la formule cytologique peut donner d'excellentes indications sur la nature de divers exsudats, liquides de pleurésie, de péricardite, de péritonite, sérosité articulaire ou d'hydrocèle, liquide céphalo-rachidien. Dans le cas de tuberculose, les lymphocytes sont très abondants, alors que les polynucléaires font défaut ou ne se rencontrent qu'en très petit nombre ; les polynucléaires sont au contraire très abondants lorsqu'il n'y a pas infection tuberculeuse. Toutefois, comme le disent Netter et Gendron (2), la lymphocytose peut exister dans des états méningés qui n'ont rien de tuberculeux ; d'autre part, il existe des méningites tuberculeuses avec polynucléose. La méthode n'est cependant pas assez sûre pour servir seule à un diagnostic précoce ; elle doit être complétée par d'autres éléments.

BACILLES PSEUDO-TUBERCULEUX OU PARATUBERCULEUX.

LEUR DIFFÉRENCIATION AVEC LE BACILLE DE LA TUBERCULOSE.

En exposant les méthodes spéciales de coloration du *Bacille de la tuberculose* et sa résistance à l'action des agents décolorants, particulièrement aux acides, Koch, en 1884, faisait remarquer que le fait n'était pas absolument spécial à cette espèce, mais que le *Bacille de la lèpre* présentait aussi la même particularité. Un peu plus tard, Lustgarten, puis Alvarez et Tavel faisaient connaître le même fait pour le *Bacille du smegma*.

Des recherches ultérieures ont permis de reconnaître toute une série d'espèces qui, commes celles qui viennent d'être citées, présentent, après coloration par les méthodes spéciales, le caractère de résister, à un degré variable toutefois, à l'action des agents de décoloration, surtout à celle des solutions acides employées comme telles. On les désigne sous les noms de *Bacilles résistant aux acides*, *Saürefestenbacillen*, *Bacilles acido-résistants* ; ou encore sous les noms de *Paratuberculibacilles*, *Bacilles paratuberculeux*, ou sous celui de *Bacilles pseudo-tuberculeux*, bien qu'ils puissent n'avoir aucun rapport avec les formes de pseudo-tuberculose qui seront étudiées plus loin.

Severin (3) a cité le premier un Bacille rencontré dans le crottin de cheval, qui présente cette particularité de coloration.

(1) Widal et Ravaut, Recherches sur l'agglutination du Bacille de Koch et le cytodiagnostic (*Gaz. des hôp.*, 1901, n° 94).

(2) Netter et Gendron, Le diagnostic de la méningite tuberculeuse par la ponction lombaire (*Soc. de pédiatrie*, mai 1911).

(3) Severin, Die im Miste vorkommenden Bakterien und deren physiologische Rolle bei der Zersetzung derselben (*Centralbl. für Bakt.*, 2ᵉ Abth., I, 1895, p. 97 et 60).

Ferran (1) dit en trouver dans les excréments de vache, de cheval et d'homme.

A. Moeller (2) en étudie et décrit bien trois espèces.

L'une se rencontre surtout dans les excréments de vache, même tout à fait saines : c'est son *Mistbacillus* ; une autre s'isole facilement de la surface de certaines herbes, la *Fléole* surtout (*Phleum pratense*, *Timotheegras*), d'où ses noms de *Grasbacillus I*, *Timotheebacillus*, *Bacille de la Fléole* ; une troisième, son *Grasbacillus II*, ou *Bacille de l'herbe*, se rencontre sur l'herbe ordinaire, dans la poussière des plantes ou de greniers à fourrage.

Depuis ces recherches de Moeller, des Bacilles acido-résistants ont été signalés dans bien des cas, dont pas mal sont intéressants à connaître en vue d'une confusion possible avec le Bacille de Koch. De nombreux observateurs en ont signalé dans le milieu extérieur, chez l'homme malade ou sain, chez des animaux.

Petri (3), Lydia Rabinowitch (4), Korn (5), Maria Tobler (6) en ont rencontré assez fréquemment dans le beurre, en y recherchant le *Bacille tuberculeux* ; le même résultat a été obtenu par Binot (7), par Herbert (8), par Beck (9). Moeller en avait déjà trouvé dans le lait, provenant probablement des poussières des fourrages ou des excréments des vaches ; beaucoup en ont retrouvé depuis ; le fait est important à connaître lors de la recherche du *Bacille de la tuberculose* dans le lait. Karlinski (10) en signale dans l'eau, la terre, le sable ; Herr (11) dans la terre de champs cultivés ; Spina (12), Houston dans les eaux d'égout.

(1) Ferran, Nouvelles découvertes sur le Bacille de la T. et la solution expérimentale du problème de la prophylaxie et de la guérison de cette maladie (*C. R. de l'Acad. des sc.*, 31 mai 1898).

(2) Moeller, Ueber dem Tuberkelbacillus verwandte Mikroorganismen (*Therapeut. Monatshefte*, novembre 1898). — Ein Mikroorganisme welcher sich morphologisch und tinktoriel wie der Tuberkelbacillus verhält (*Deutsche med. Wochenschr.*, 1898 nº 24, p. 376). — Eine neuer Saüre und alkoholfester Bacillus aus der Tuberkelbacillengruppe, welcher echte Verzweigungsformen bildet (*Centralbl. für Bakt.*, XXV, 1899, p. 369). — Die Beziehung der Tuberkelbacillus zu den anderen saürefesten Bakterien und zu den Strahlenpilze (*Ibid.*, XXX, 1901, p. 513). — Ueber saürefeste Bakterien (*Deutsche med. Wochenschr.*, XXVIII, 26 juin et 3 juillet 1902).

(3) Petri, Zum Nachweis der Tuberkelbacillen in Butter und Milch (*Arb. aus dem kaiserl. Gesundheitsamte*, XIV, 1898, p. 1).

(4) Lydia Rabinowitch, Zur Frage des Vorkommens von Tuberkelbacillen in der Marktbutter (*Zeitschr. für Hygiene*, XXVI, 1897, p. 90).

(5) Korn, Tuberkelbacillenbefunde in der Marktbutter (*Arch. für Hygiene*, XXXVI, 1899, p. 57). — Zur Kenntniss der Saürefestbacillen (*Centralbl. für Bakt.*, XXV, 1899, p. 532, et XXVII, 1900, p. 480).

(6) Maria Tobler, Beitrag zur Frage der Vorkommens der Tuberkelbacillen und anderen saürefesten Bacillen in der Marktbutter (*Zeitschr. für Hygiene*, XXXVI, 1901 p. 120).

(7) Binot, *in* Borrel, Bacilles tuberculeux et paratuberculeux (*Bull. de l'Inst. Pasteur*, II, 1904).

(8) Herbert, Untersuchungen über das Vorkommen von Tuberkelbacillen in der Marktbutter (*Centralbl. für Bakt.*, XXVII, 1900, p. 390).

(9) Beck, Zur Frage der säurefesten Bacillen (*Tuberk. Arb. a. d. kaiserl. Gesundheitsamt*, 1905, III, p. 145).

(10) Karlinski, Zur Kenntniss der saürefesten Bakterien (*Centralbl. für Bakt.*, XXXIX, 1901, p. 521).

(11) Herr, Ein Beitrag zur Verbreitung der saürefesten Bacillen (*Zeitschr. für Hygiene*, XXVIII, 1901, p. 201).

(12) Spina, *Allgem. Wiener med. Zeitschr.*, 1883, p. 169.

Chez l'homme, Moeller (1) en a isolé le premier de crachats de bronchite. Pappenheim (2), Fraenkel (3) en signalent dans des cas de gangrène pulmonaire comme *Bacilles du smegma*, d'après un simple examen microscopique; ils ont du reste été rencontrés souvent depuis dans cette affection, entre autres par Lydia Rabinowitch (4), Folli (5), Ophüls (6), Mayer (7), Ohlmacher (8). Zupnik, Birt et Leishman (9) en trouvent dans les crachats tuberculeux; Lichtenstein (10) dans des crachats de bronchite avec hémoptysies, absolument inoffensifs pour les cobayes, au point de vue de la tuberculose; Bezançon, Griffon et Philibert (11) en signalent dans le sang et dans les exsudats pleurétiques; Rappin (12) dans l'urine de syphilitiques. Ginsberg (13) en reconnaît dans plusieurs affections oculaires simulant la tuberculose.

Mironescu (14) en trouve dans les selles d'un typhique non tuberculeux; Poscharyski (15) dans l'urine et les organes d'enfants morts d'autre chose que de tuberculose; Stolz (16), Dittrich (17), Laser (18), Czaplewski (19), dans des affections uro-génitales tout à fait indépendantes de la tuberculose.

Chez l'homme sain, ils paraissent aussi très fréquents. Gottstein (20), puis Bienstock (21) les signalent dans le cérumen. Kar-

(1) Moeller, Zur Verbreitungsweise der Tuberkelpilze (*Zeitschr. für Hygiene*, XXXII, 1899, p. 205).

(2) Pappenheim, Befund von Smegmabacillen in menschlichen Lungenauswurf (*Berl. klin. Wochenschr.*, 1898, n° 37).

(3) Fraenkel, Einige Bemerkungen über das Vorkommen von Smegmabacillen im Sputum (*Berlin. klin. Wochenschr.*, 1898, n° 40).

(4) Lydia Rabinowitch, Befund von saürefesten, Tuberkelbacillen ähnlichen Bakterien bei Lungengangrän (*Deutsche med. Wochenschr.*, 1900, n° 16).

(5) Folli, Bacilli resistenti agli acidi nelle gangrene (*Riforma medica*, 27 août 1901).

(6) Ophuls, Acid-proof bacilli in five cases of pulmonary Gangrene (*Journ. of med. Researche*, VIII, 1902, n° 1, p. 242).

(7) Mayer, Briefe aus Ostasien (*Munch. med. Wochenschr.*, 1901, n° 44, p. 1775).

(8) Ohlmacher, An atypical acid-and alcohol-proof fungus from the sputum of a case clinical ressembling pulmonary tuberculosis (*Transact. of the Chicago path. Soc.*, V, 1901, et *Cleveland med. Journ.*, janvier 1902).

(9) Birt et Leishman, A new acid-fast streptothrix, pathogenic to man and animals (*The Journ. of Hygiene*, II, 1902, p. 120).

(10) Lichtenstein, *Deutsche med. Wochenschr.*, 27 mars 1902.

(11) Bezançon, Griffon et Philibert, Causes d'erreur dans le diagnostic du Bacille tuberculeux (*Soc. de Biol.*, 7 février 1903).

(12) Rappin et Heurot, Bacilles acido-résistants dans l'urine (*Soc. de Biol.*, mai 1903).

(13) Ginsberg, Ueber der Tuberkulose ähnliche Augenerkrankungen mit saüreresistenten Bacillen (*Centralbl. für Augenheilk.*, 1897, p. 131).

(14) Mironescu, Ueber der Vorkommen von Tuberkelähnlichen Bakterien im menschlichen Fœces (*Zeitschr. für Hygiène*, 1901, XXVII, p. 497).

(15) Poscharyski, Zur Frage der Bakteriurie bei Kindern (An. in *Centralbl. für Bakt.*, XXXII, Referate, 1902, p. 295).

(16) Stolz, Ueber einen Bacillus mit Verzweigungen (*Arch. für Hygiène*, 1897, XXX, p. 156).

(17) Dittrich, Saürefeste Bakterien in einer vereiterten Ovarialkyste (*Berl. klin. Wochenschr.*, 1899, p. 189).

(18) Laser, Ueber Reinkulturen Smegmabacillen (*Munch. med. Wochenschr.*, 1897, n° 43).

(19) Czaplewski, Zur Kenntniss der Smegmabacillen (*Ibid.*, 1897, n° 43).

(20) Gottstein, Die Beimflussung des Farbenverhaltens von Mikroorganismen durch Fitte (*Fortschrifte der Medizin*, 1886, p. 252).

(21) Bienstock, Zur Frage der sogenannten Syphilisbacillen und der Tuberkelbacillen Farbung (*Ibid.*, 1896, p. 193).

linski (1) en rencontre dans le mucus nasal, Marzinowski (2) et Beck (3) dans les cryptes amygdaliennes, Moeller dans le tartre dentaire et l'enduit lingual.

Chez les animaux, ils semblent être tout aussi communs que chez l'homme. Ils doivent abonder dans le contenu intestinal; Séverin, Moeller, Cappaldi les ont trouvés dans les excréments (p. 776). Strasburger (4) les rencontre dans l'intestin du bœuf : Cowie (5) sur le pis des vaches : Preicz (6) dans le mucus nasal du bœuf. Moeller (7) en a trouvé un type, voisin des Bacilles du beurre, dans un cas de pseudo-tuberculose de la vache. Oltzchanetzky (8) en a isolé un d'un abcès du foie chez un rat d'égout, Stefansky (9) un autre dans une sorte de *pseudo-lèpre* des rats.

C'est là, on le voit, une répartition extrêmement étendue, qui doit certainement attirer l'attention et justifie les nombreux travaux faits sur la question (10).

Cet exposé sommaire montre que dans bien des cas la confusion avec le Bacille de Koch est possible; elle est à craindre, en effet, si l'on se borne à la seule constatation des réactions de coloration dans des conditions insuffisantes, d'autant plus que les différences de formes sont peu considérables et que d'ailleurs, sous ce rapport, le *Bacille tuberculeux* peut présenter des variations assez grandes (p. 686). Il devient alors nécessaire de serrer l'examen de plus près, de rechercher d'autres caractères distinctifs et d'abord de connaître mieux ces *Bacilles pseudo-tuberculeux*.

Leur morphologie ne présente rien de particulier. D'une façon générale, on peut les grouper suivant deux types. L'un de ces types, qui est celui du *Timotheebacillus* et du *Mistbacillus*, a des bâtonnets assez grêles, légèrement courbés, rappelant plutôt les formes les plus habituelles du *Bacille tuberculeux*. L'autre type, qui est celui du *Grasbacillus II* ou *Bacille de l'herbe* et aussi des Bacilles du lait et du beurre, a des éléments

(1) Karlinski, Zur Kenntniss der saürefesten Bakterien (*Centralbl. fur Bakt.*, XXIX, 1901, p. 521).

(2) Marzinowski, Ueber einige in den krypten der Gemmenmandeln gefundene Bacillenarten (*Ibid.*, XXVIII, 1900, p. 39).

(3) Beck, Zur Frage der saürefesten Bacillen (*Tuberkulose Arbeiten a. d. kaiserl. Gesundheitsamte*, 1905, III, p. 145).

(4) Strasburger, Ueber den Nachweis von Tuberkelbacillen in den Fäces (*Münch. med. Wochenschr.*, 1900, p. 533).

(5) Cowie, *Journ. of exper. Med.*, 1900, V, p. 205

(6) Preicz, cité par Pertig, *Ergeb. der allg.*, 1900.

(7) Moeller, Ueber die Beziehungen der Tuberkelbacillen zu den andern saürefesten Bakterien und zum Strahlenpilze (*Centralbl. für Bakt.*, I Abth., XXX, 1901, p. 513).

(8) Oltzchanetzky, Ueber ein neue alkohol und saürefestes Stäbchen (*Centralbl. fur Bakt.*, XXXII, Originale, 1902, p. 16).

(9) Stefansky, Eine Lepraahnliche Enkrankung der Haut und der Lymphdrusen bei Wanderratten (*Centralbl. für Bakt.*, I Abth., Orig., 1903, XXXIII, p. 481).

(10) Voy. en outre les Revues générales suivantes : Kayser, Beitrage zur Differentialdiagnose zwischen den echten Tuberkelbacillen und den beiden Saürefesten Bacillen Grasbacillus Timothee-Görbersdorf und Butterbacillus Rabinowitch. Thèse de Rostock, 1902. — Potet, Études sur les Bactéries dites *acidophiles*. Thèse de Lyon, 1902. — Kayserling, Die Pseudotuberkelbacillen (*Zeitschr. fur Tuberkulose*, III, 1902, p. 24). — Borrel, Bacilles tuberculeux et paratuberculeux (*Bull. de l'Inst. Pasteur*, II, 1904, p. 409). — Sterioportlo, Les Bacilles tuberculeux et autres Bacilles acido et alcoolo-résistants: leurs rapports réciproques (*Inst. bacteriol. de Moscou*, 1908). — Philibert, Les Pseudobacilles acido-résistants. Thèse de Paris, 1908.

plus épais et plus longs. Dans les deux types, on constate une tendance plus grande que chez le *Bacille tuberculeux* à donner des filaments dans certaines cultures. Dans les vieilles cultures, sur gélose spécialement, on trouve des formes très courtes, presque en coccus, beaucoup d'éléments, ramifiés en Y, disposés en massues, ce qui peut se voir aussi chez le Bacille tuberculeux et rappelle souvent le Bacille de la diphtérie. Abbott et Gildersleeve (1) ont vu le *Timotheebacillus* et le *Grasbacillus II* donner, dans le rein du lapin, des amas radiés semblables aux granulations d'*Actinomyces*, ce que peut aussi produire le *Bacille tuberculeux* dans certaines conditions (p. 688).

Au point de vue coloration, on trouve, parmi ces espèces, de très grandes différences. Il en est qui se décolorent bien plus facilement que le *Bacille tuberculeux*, ne résistant pas quelques instants à l'action des solutions acides employées. D'autres résistent, au contraire, beaucoup à la décoloration : le Bacille trouvé par Karlinski dans le mucus nasal résiste pendant dix minutes et plus à l'action de l'acide azotique au tiers lorsqu'il provient de jeunes cultures, tandis que celui provenant de vieilles cultures se décolore très vite. Le Bacille isolé par L. Rabinowitch dans un cas de gangrène pulmonaire résiste aussi au moins autant que le *Bacille de la tuberculose* à la décoloration.

Pour apprécier d'une manière exacte le degré de résistance à la décoloration, l'acido-résistance particulièrement, et en faire un caractère réellement différentiel, il est nécessaire d'employer une méthode convenable. Celle qui est à conseiller est la méthode de Ziehl modifiée par Philibert, telle qu'elle a été exposée p. 692. Les Bacilles acido-résistants faibles, c'est-à-dire la plupart des acido-résistants connus, se décoloren toujours et sûrement, alors que le Bacille de Koch reste toujours coloré.

L'application graduée de la décoloration permet de distinguer, parmi ces espèces, des variantes notables dans la résistance.

Il est des espèces qui sont énergiquement acido-résistantes et alcoolo-résistantes, tout comme le Bacille de Koch : la résistance est chez elles un caractère fondamental, spécifique, se transmettant héréditairement, existant chez l'espèce quelle que soit la composition du milieu où elle vit. Ce sont ces espèces que Beck appelle *Bacilles tuberculoïdes*.

Il est par contre d'autres espèces acido-résistantes où ce caractère n'est pas fondamental, mais acquis à la suite de l'action de certaines conditions spéciales du milieu, ne se transmet pas héréditairement quand ces conditions font défaut. Ce sont elles que Bezançon et Philibert (2) dénomment *Bacilles pseudo-acido-résistants*.

Dans le premier groupe, des Bacilles acido-résistants vrais, se rangent la plupart des Bacilles du beurre et du lait, le Bacille de Petri, les Bacilles de Korn I et II, les Bacilles de Tobler I à V, le Bacille de Binot, le Bacille de Beck, le Bacille de Grasberger, le Bacille de Moeller. Puis le Bacille de la fléole, le Grasbacillus II, le Mistbacillus de Moeller. En outre, le Bacille trouvé par Moeller dans la sérosité d'un vésicatoire, le Bacille

(1) Abbott et Gildersleeve, On the Actinomyces-like development of some of the acid resisting bacilli (*Centralbl. für Bakt.*, XXXI, Originale, 1902, p. 547).

(2) Bezançon et Philibert, Relations entre le Bacille de Koch et les Bacilles acido-résistants (*Congrès de la tuberculose*, Paris, 1905, I, p. 148). — Philibert, *loc. cit.*, p. 692).

trouvé par L. Rabinowitch dans un cas de gangrène pulmonaire, le Bacille de Mironescu, le Bacille trouvé par Beck sur l'amygdale d'une femme tuberculeuse. A côté, on doit ranger le Bacille de la lèpre, le Bacille de la verruga, le Bacille trouvé par Ginsberg dans l'œil malade, le Bacille trouvé par Oltzchanetzky chez le rat d'égout, le Bacille trouvé par Stefansky dans une pseudo-lèpre des rats, et, à un degré de résistance moindre cependant, le Bacille du mucus nasal de Karlinski.

Leur différenciation d'avec le Bacille de Koch est par là plus difficile, incomplète. Mais il faut remarquer qu'on ne les rencontre que bien rarement chez l'homme, puisqu'il n'existe que ces trois ou quatre cas uniques, lèpre et verruga mises à part, le cas de Beck qui a rencontré son Bacille sur l'amygdale d'une femme tuberculeuse, le cas de L. Rabinowitch qui a trouvé le sien dans un cas de gangrène pulmonaire, le cas de Moeller qui a trouvé le sien dans la sérosité d'un vésicatoire, le cas de Mironescu qui a trouvé le sien dans les fèces d'un typhique. Encore, le Bacille de Beck paraît être plutôt un *Bacille tuberculeux* d'une race atténuée, puisqu'il tue le cobaye en huit ou dix semaines avec des tubercules dans le poumon et une rate très grosse, et le Bacille de Mironescu est très probablement un Bacille du lait, au régime duquel était soumis son malade.

Reste donc à distinguer le Bacille de L. Rabinowitch, qui végète en vingt-quatre heures sur les milieux ordinaires et, inoculé au cobaye, ne donne qu'un abcès local, pas de généralisation; puis le Bacille de Moeller qui n'est pas pathogène pour le cobaye. La distinction se simplifie considérablement et devient facile à faire par ces autres caractères.

Dans le second groupe, des Bacilles faiblement acido-résistants, ou Bacilles pseudo-résistants, se rangent un nombre assez élevé d'espèces chez lesquelles la propriété d'acido-résistance n'est pas fondamentale, spécifique, constante, mais liée aux conditions de vie dans des milieux spéciaux, où se trouvent le plus souvent des matières grasses, des matières sébacées, de la cholestérine, de la lécithine. On en trouve de nombreux types chez l'homme, dans le smegma, le sébum, les comédons le cérumen; dans la gangrène pulmonaire, les crachats de bronchite et de dilatation bronchique; dans certaines suppurations spéciales, celles de l'oreille, celle d'un kyste de l'ovaire; dans des liquides séro-fibrineux d'épanchements divers; dans le sang, dans les cadavres.

Ce qui montre bien qu'ici l'acido-résistance est une propriété acquise, transitoire, c'est qu'elle disparaît dans les cultures de ces espèces sur des milieux habituels, sans graisses. De plus, on peut la faire apparaître chez des espèces ordinaires bien connues, en les cultivant en présence de certaines substances. Bienstock et Gottstein ont déterminé un degré assez marqué d'acido-résistance au *Bacille du charbon*, au *Colibacille*, au *Bacillus subtilis*, en les faisant vivre dans des milieux additionnés de beurre ou de lanoline; Philibert a obtenu des résultats bien positifs dans les mêmes conditions avec le *Bacille diphtérique*. Toutefois, aucun de ces Bacilles n'est devenu alcoolo-résistant.

La distinction de ces Bacilles faiblement acido-résistants avec le Bacille de Koch a une très grande importance au point de vue clinique en raison surtout de leur présence facile dans l'urine, souvent souillée par du smegma, dans les crachats, dans les épanchements de pleurésie, d'ascite, etc.

On les distingue aisément en employant la décoloration rigoureuse par l'acide nitrique au tiers d'abord, puis par l'alcool fort, indiquée p. 692. Ces Bacilles acido-résistants sont toujours décolorés par l'acide nitrique au tiers après deux minutes au plus, tandis que le Bacille de Koch reste toujours coloré ; ces mêmes Bacilles sont décolorés en quelques minutes par l'alcool fort, alors que le Bacille de Koch résiste pendant plus d'une heure.

En plus des réactions de coloration, on peut utiliser, pour distinguer les Bacilles pseudo-tuberculeux du Bacille de Koch, d'autres propriétés.

La mise en cultures donne des caractères différentiels importants. Les *Bacilles pseudo-tuberculeux* poussent à la température ordinaire, lentement de 12° à 20°, assez bien à 20° et au mieux à 37°. Vers 18° à 20° on peut déjà constater, après vingt-quatre heures, la présence de colonies bien visibles, lorsqu'on se sert de cultures entraînées ; celles qui proviennent de produits naturels mettent un peu plus de temps à apparaître. En tout cas, sur tous les milieux les colonies apparaissent à de plus basses températures et toujours bien plus tôt que celles du Bacille de Koch.

Ces divers *Bacilles pseudo-tuberculeux* croissent très bien en concurrence avec d'autres Bactéries, lorsqu'on ensemence un produit complexe, ce qui ne s'observe pas avec le Bacille de Koch.

On peut se servir de ces particularités de végétation dans les cas où l'on a un doute. Le produit examiné, crachats, mucus ou autre, est mélangé à un peu de bouillon stérilisé et placé quelque temps à 30°. Si, après quelques heures, il y a augmentation notable de Bacilles ne se décolorant pas aux acides, on est en droit de penser qu'on n'est pas en présence de Bacille tuberculeux vrai, qui ne se développerait pas dans ces conditions, puisqu'il ne végète guère qu'après quarante-huit heures et dans des milieux spéciaux, renfermant certaines substances albuminoïdes. C'est déjà un bon moyen de différenciation.

Les caractères des cultures sur les différents milieux offrent aussi de très bons éléments de différenciation.

Tous ces Bacilles sont pathogènes pour le cobaye. Mais au lieu d'occasionner chez lui des lésions de généralisation comme le fait le Bacille de Koch, ils ne déterminent que des lésions locales et de voisinage immédiat, comme dans leur inoculation dans la peau ou le péritoine, jamais, ou d'une façon tout à fait exceptionnelle, la formation de lésions noduleuses à distance.

Il est un certain nombre de ces espèces qui sont plus importantes à connaître, soit en raison de leur répartition très étendue, soit en raison de leur rencontre dans des conditions qui doivent particulièrement attirer l'attention. Leurs principaux caractères vont être exposés.

BACILLE DU SMEGMA.

Lustgarten (1) annonçait, en 1884, la découverte, dans les sécrétions et tissus syphilitiques, d'un Bacille spécial, se distinguant surtout par sa situation dans l'intérieur des cellules migratrices et la façon dont il se comportait envers les matières colorantes.

(1) Lustgarten, Die Syphilisbacillen. Wien, 1885.

Le procédé de coloration qu'il indique est assez particulier; il est, du reste, connu sous le nom de *méthode de Lustgarten*. Les lamelles, préparées avec les sécrétions ou les coupes de tissus malades, sont soumises, de douze à vingt-quatre heures, à l'action d'un bain colorant d'eau anilinée additionnée de violet de gentiane, que l'on porte ensuite à l'étuve à 40° pendant deux heures. On lave les lamelles à l'eau distillée et les coupes à l'alcool; puis on les plonge pendant dix secondes dans une solution de permanganate de potasse à 1 p. 100. Il se forme tout autour un précipité floconneux, brunâtre, d'oxyde de manganèse. Les préparations sont ensuite passées dans une solution aqueuse concentrée d'acide sulfureux, qui doit être fraîchement préparée en faisant agir de l'acide sulfurique sur la tournure de cuivre, et conservée dans de petits flacons bien bouchés et qu'on ouvre successivement pour l'usage. On lave à l'eau distillée, puis on repasse dans le permanganate de potasse et l'acide sulfureux, et ainsi de suite, trois, quatre et six fois, jusqu'à décoloration complète. Les préparations sont alors lavées, déshydratées par l'alcool, éclaircies par l'essence de cèdre et montées dans le baume.

On colore de cette façon des Bacilles qui sont libres ou plus souvent renfermés dans les cellules, soit isolés, soit par groupes de deux à huit.

Ils mesurent de 3 μ à 7 μ de long sur 0,2 μ à 0,3 μ de large; ils sont souvent courbés, parfois même en S; ils présentent fréquemment des vacuoles ovoïdes, que Lustgarten regarde sans preuves comme des spores, ou sont moniliformes comme parfois les Bacilles tuberculeux.

Alvarez et Tavel (1) ont rencontré dans un grand nombre de sécrétions normales et dans quelques sécrétions pathologiques non syphilitiques, en particulier dans le *smegma préputial*, un Bacille identique par sa forme et ses réactions colorantes au Bacille de Lustgarten. Ils le rencontrent d'une façon presque constante dans le sillon balano-préputial, au niveau de l'anus, dans la région génitale. Ils concluent que le Bacille de Lustgarten est un saprophyte normal du smegma. Il a été nommé *Bacille du smegma*.

Les différents procédés de coloration employés pour le *Bacille de la tuberculose*, surtout la méthode de Ziehl Nielsen, leur ont donné de bons résultats et colorent aussi le *Bacille du smegma* qui présente une résistance moindre à la décoloration que le *Bacille de la tuberculose*, se décolore par les acides en moins de deux minutes et rapidement par l'alcool.

La distinction est en outre facile, parce qu'on en obtient facilement des cultures dans les conditions habituelles.

Laser (2) a le premier obtenu des cultures en prenant de la semence sur des plaques muqueuses syphilitiques. Il recommande comme meilleur milieu la gélose à la surface de laquelle on a étalé un peu de sang humain recueilli aseptiquement. Il s'y forme de très petites colonies à la surface. Ces cultures ne donnent rien sur gélatine, presque rien sur gélose ordinaire et sur bouillon. Sur sérum et sur gélose glycérinée, on a de petites colonies transparentes, ressemblant à des gouttes de

(1) ALVAREZ et TAVEL, Recherches sur le Bacille de Lustgarten (*Arch. de physiol.*, 1885, p. 303).

(2) LASER, Ueber Reinkulturen der Smegmabacillen (*Munch. med. Wochenschr.*, 1897, p. 1191).

rosée. Le microbe pousse sur pomme de terre, mais sans former de colonie visible. La gélose et la gélatine glucosée permettent aussi un petit développement.

Czaplewski (1), en partant de pus blennorragique, a pu cultiver ce même microbe sur le milieu recommandé par Wassermann pour le Gonocoque (*Nutroseserum agar*, p. 524). Il y forme de petites colonies arrondies qu'il est facile de reporter sur d'autres milieux.

Sur *sérum peptonisé coagulé*, on obtient, en deux jours, des colonies gris jaunâtre qui peuvent confluer en une bande assez épaisse.

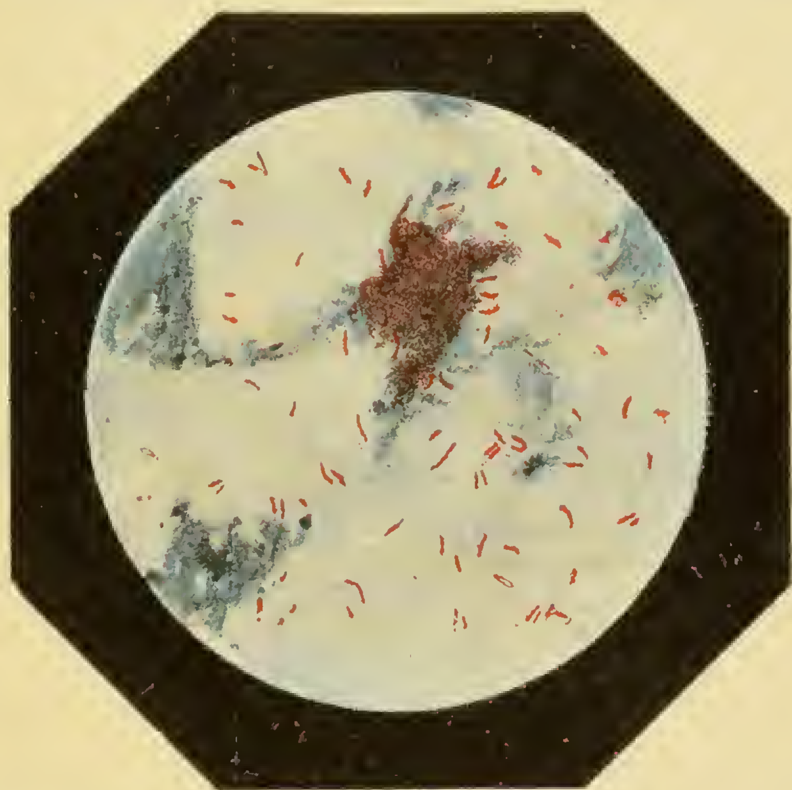


Fig. 270. — Bacille du smegma. Coloration par la méthode d'Ehrlich.

Sur *gélose glycérinée*, en deux jours il s'est formé une colonie assez épaisse, grisâtre, souvent sèche.

Sur *gélatine*, le développement est lent à cause de la basse température à employer ; il se fait une mince culture transparente.

Le *bouillon* se trouble ; on voit de petites écailles à la surface.

Sur *pomme de terre*, il se fait une culture grisâtre, abondante, brillante.

Dans le *lait*, le développement se fait très bien, sans déterminer de coagulation.

Neufeld (2) a observé des cultures semblables en partant du smegma.

Les Bacilles des cultures sont immobiles et présentent toujours la résistance à la décoloration par les acides.

La forme et les dimensions sont très variables (3). Dans les cultures

(1) Czaplewski, Zur Kenntniss der Smegmabacillen (*Munch. med. Wochenschr.*, 1897, p. 1192).

(2) Neufeld, Beitrag zur Kenntniss der Smegmabacillen (*Arch. für Hygiene*, XXXIX, 1900, p. 184).

(3) Moeller, Der Smegmabacillus (*Centralbl. für Bakt.*, XXXI, Originale, 1902, p. 278).

jeunes, les bâtonnets sont minces et grêles, parfois légèrement courbés, comme ceux de Laser; dans les vieilles cultures, ils sont plus épais et parfois, dans le lait surtout, on trouve des éléments renflés, moniliformes, même parfois ramifiés, rappelant le *Bacille diphtérique* ou le *Bacille pseudo-diphtérique*.

Le *Bacille du smegma* paraît n'avoir aucune propriété pathogène.

Il semble être très répandu chez l'homme. On l'a signalé en outre dans la bouche, les crachats, dans l'urine, sur la peau, dans des sécrétions très diverses, où peut-être il a été confondu avec d'autres *Bacilles pseudo-tuberculeux*. Il est surtout fréquent dans l'urine ; d'après Grünbaum (1) on le rencontre rarement dans l'urine de l'homme, mais très souvent (59 p. 100) dans l'urine de la femme recueillie après miction naturelle. On en trouve même parfois dans les urines recueillies après cathétérisme.

C'est bien probablement le *Bacille du smegma* que Moeller (2) a trouvé dans la sérosité d'un vésicatoire et dans le sébum de l'ombilic.

Ces faits sont importants à connaître pour la recherche du *Bacille de la tuberculose*. La distinction se fait aisément en usant d'une façon rigoureuse de la méthode de coloration indiquée page 692 ; le *Bacille du smegma* est constamment décoloré.

BACILLE DE LA FLÉOLE, TIMOTHEEBACILLUS DE MOELLER.

Moeller (3) dit qu'on le trouve surtout sur la fléole des prés *Timotheegras*, *Phleum pratense*, flouve odorante) et sur quelques autres herbes, jamais sur la plupart.

Pour l'obtenir, il met des fragments de l'herbe dans de l'eau stérilisée qu'il place à l'étuve à 37°. De huit à quinze jours, en faisant des frottis avec des morceaux d'herbe, et colorant les préparations à la méthode de Ziehl-Nielsen, on constate la présence de Bacilles acido-résistants. En ensemençant des plaques de gélose glycérinée avec de ces mêmes fragments, on obtient bientôt des colonies de Bacilles acido-résistants qu'on peut réensemencer.

Dans les frottis, on trouve des bâtonnets de 1 à 4 μ de long sur 0,2 μ à 5 μ de large, droits ou souvent courbés, isolés ou réunis en filaments segmentés ou en amas, quelquefois renflés à une extrémité, même ramifiés. La forme change un peu dans les cultures ; plus trapus sur le sérum, les éléments sont plus déliés dans le lait. Vus sans coloration, les Bacilles sont immobiles.

Il *reste coloré* par la méthode de Gram. Comme le Bacille de Koch, il résiste bien à la décoloration par les acides et l'alcool fort. C'est là aussi, pour lui un caractère spécifique et toujours héréditaire.

Le développement se fait bien à 37° ; les colonies apparaissent

(1) Grunbaum, Zur Frage der Züchtung der Smegmabacillen (*Munch. med. Wochenschr.*, 1897, n° 45, p. 1254).

(2) Moeller, Ein neues saur und alkoholfester Bacillus aus den Tuberkelbacillen gruppe (*Centralbl. für Bakt.*, 1 Abth., XXV, 1899, p. 369).

(3) Moeller, Ueber dem Tuberkelbacillen verwandte Mikroorganismen (*Wiener med. Wochenschr.*, 1898, n° 50).

déjà après trente-six heures; mal à la température de la chambre.

Gélose glycérinée. — En strie, à 37°, les colonies sont visibles en trente-six à quarante-huit heures; elles augmentent assez vite et confluent. En huit jours, on a une culture sèche plissée, assez épaisse, d'abord blanche, puis grise ou jaunâtre, parfois orangée.

Gélose-ascite. — Les caractères sont les mêmes, mais la coloration est plutôt rosée ou chamois, comme certaines cultures de Bacille tuberculeux.

Gélatine. — Le développement est très lent et maigre; en sept à huit jours, on a une petite culture jaune rougeâtre. La gélatine n'est pas liquéfiée.

Sérum coagulé. — La culture est assez maigre et reste plutôt blanchâtre.

Pomme de terre glycérinée. — La culture se fait bien à 37°. Elle devient assez épaisse, plissée, jaune rougeâtre ou saumonée ; sur le liquide en excédent, se continue un voile plissé de même aspect.

Bouillon glycériné. — Il se fait un voile épais, plissé, jaune d'or.

Lait. — On a un voile jaune ou un anneau jaunâtre ; le liquide prend souvent une teinte légèrement rosée. Il ne se coagule jamais.

La plupart des observateurs disent qu'ils n'ont jamais pu constater d'indol dans les cultures; pour certains, on en rencontrerait quelque fois.

D'après Moeller, si l'on vient à traiter les cultures sèches par l'acide sulfurique, on obtient une coloration bleue.

Ce Bacille semble nettement pathogène pour le cobaye, mais l'action est encore à bien étudier.

En inoculation sous-cutanée, il peut occasionner la mort, mais sans lésions apparentes; on retrouve des Bacilles dans le sang ; d'autres fois on n'obtient rien.

En inoculation intrapéritonéale, on produit d'ordinaire une péritonite hyperplasique à fausses membranes ; on peut trouver sur le sérum des granulations avec cellules géantes et Bacilles, pouvant devenir caséeuses.

Schultze (1) et Lubarsch (2), en injectant des cultures dans le rein du lapin, ont vu se développer des amas rayonnés, avec filaments ramifiés et massues, d'aspect actinomycosique, comme cela s'observe avec le Bacille de Koch par injection dans le cerveau ou le rein.

Dans les méninges du chien, Armand Delille (3) a obtenu une formation plastique avec formation de petits nodules ne montrant ni cellules géantes ni Bacilles. La réaction serait due, pour lui, aux matières grasses ou cireuses des corps bacillaires.

D'après Cantacuzène (4), les animaux inoculés réagiraient à la tuberculine et à la paratuberculine spéciale. Cette paratuberculine pourrait déterminer une hyperthermie de 2°,5 chez le cobaye tuberculeux. Les

(1) SCHULTZE, Untersuchungen über die Strahlenpilzformen der Tuberkuloserregers (*Zeitschr. für Hygiène*, XXXI, 1899, p. 153).

(2) LUBARSCH, Zur Kenntniss der Strahlenpilzen (*Ibid.*, p. 187).

(3) ARMAND DELILLE, De la réaction plastique dans les méninges aux Bacilles pseudo-tuberculeux (*Soc. de Biol.*, 12 juillet 1902).

(4) CANTACUZÈNE, Recherches sur l'infection expérimentale par les Bacilles paratuberculeux (Bacille de Timothée) (*Congrès de la tuberculose*, Paris, 1905, I, p. 158).

corps bacillaires dégraissés sont nettement toxiques et ont un pouvoir caséifiant analogue à celui que l'on observe chez le Bacille de Koch.

On n'a jamais rencontré ce Bacille chez l'homme ou chez les animaux.

BACILLE DE L'HERBE, GRASBACILLUS II DE MOELLER.

Ce Bacille se trouve dans la poussière sèche des herbes, dans celle des greniers à fourrages. Moeller (1) l'a obtenu en ensemençant de la poussière de foin sur plaques de gélatine.

Les bâtonnets ont de 1 à 5 μ de long, sur 0,2 à 0,4 μ de large.

Ils sont souvent légèrement courbés et se présentent fréquemment accolés en Y. Dans les cultures sur milieux solides, on trouve facilement des formes ramifiées ou des éléments renflés en massue. Les cultures dans le lait montrent des formes de coccothrix. Dans les jeunes cultures, on trouverait facilement des bâtonnets nettement mobiles.

Les caractères de coloration sont les mêmes que pour le *Bacille de la fléole* (Grasbacillus I de Moeller).

Les cultures sont faciles à obtenir et se développent surtout bien à 37°, moins vite vers 20°.

Gélose glycérinée. — Le développement est très abondant à 37°. En deux jours, on trouve de petites colonies en forme de gouttelettes d'eau, qui fusionnent et donnent un revêtement jaunâtre.

Dans l'eau de condensation qui reste toujours limpide, se forment des grumeaux d'un blanc jaunâtre qui se sédimentent à un moment donné.

Gélatine. — En quatre à cinq jours, vers 20°, on a une culture assez abondante, blanc grisâtre ou un peu jaunâtre. La gélatine n'est pas liquéfiée.

Sérum coagulé. — La culture, blanc grisâtre, reste assez maigre.

Pomme de terre glycérinée. — A 37°, la culture est rapide et abondante; c'est un épais revêtement blanchâtre, humide ; dans le liquide en excédent, il se forme un voile blanc, épais, plissé.

Bouillon glycériné. — Il se forme un voile grisâtre ou un peu jaunâtre, qui se fragmente facilement. Le liquide reste clair et ne possède aucune odeur.

Lait. — Le développement y est très rapide; la réaction devient assez vite acide. Il se forme une pellicule fragile à la surface ; le liquide prend une teinte brunâtre et ne se coagule pas.

L'inoculation intrapéritonéale tue le cobaye au bout de quatre à six semaines; avec des cultures dans le lait, le délai n'est que de dix à vingt jours. Les résultats obtenus sont très semblables à ceux de l'espèce précédente; il paraît cependant moins virulent. Freymuth (2) dit avoir obtenu avec lui une véritable maladie à tubercules chez les animaux à sang froid ; chez les grenouilles, crapauds, lézards, on observerait des

(1) Moeller, Ein neuer Saüre-und alkoholfester Bacillus aus der Tuberkelbacillengruppe welcher echte Verzweigungsformen bildet (*Centralbl. für Bakt.*, 1 Abth., XXV, 1899, p. 369).

(2) Freymuth, Ueber das verhalten der Grasbacillus II im Kaltblütelorganismen (*Centralbl. für Bakt.*, XXIX, 1901, p. 530).

lésions très semblables à celles qu'y produisent le Bacille aviaire et le Bacille pisciaire.

BACILLE DU FUMIER, MISTBACILLUS DE MOELLER.

Moeller l'a trouvé en faisant des préparations microscopiques de fumier. Il est commun dans les excréments de vaches, chevaux, porcs, et surtout de mulets ; peu abondant dans les excréments frais, il se trouve en grande quantité dans ceux que l'on a laissé séjourner une huitaine de jours à 37° en présence d'eau stérilisée pour éviter la dessiccation.

Les bâtonnets, qui paraissent être toujours immobiles, ont de 1 à 4 μ de long sur 0,2 à 0,4 μ de large, isolés, réunis en amas ou accolés à angle obtus, parfois renflés en massue à une extrémité. Lubarsch et Mayer (1) disent avoir observé des bâtonnets ramifiés.

La résistance de ces Bacilles à la décoloration par les acides et par l'alcool est très grande, plus forte peut-être même que celle du Bacille de Koch.

Moeller l'a obtenu en culture en ensemençant des parcelles de fumier sur des plaques de gélose glycérinée maintenues à 37°. En deux ou trois jours sont apparues de petites colonies d'abord grisâtres, puis jaunâtres et ombiliquées au centre.

Ce Bacille pousse sur tous les milieux; son optimum de développement est vers 37° ; au-dessous de 20°, sa croissance est lente.

Gélose glycérinée. — On obtient une culture abondante, jaune-orange ou jaune d'or, humide et grasse, se plissant avec l'âge.

Sérum coagulé. — La culture jaunâtre est assez peu abondante.

Gélatine. — Il s'y forme une petite culture grisâtre, ou parfois rien. La gélatine n'est pas liquéfiée. Avec addition de glycérine, la culture est plus abondante.

Pomme de terre glycérinée. — En trois ou quatre jours, on obtient de petites colonies blanchâtres qui deviennent jaunâtres. La culture n'est pas abondante. Sur le liquide en excédent, il se forme un mince voile.

Bouillon. — En deux jours à 37°, le liquide se trouble. Il se forme graduellement un dépôt jaune, pas de voile.

Lait. — On a à la surface une pellicule crémeuse blanche ou un anneau jaune. Le liquide ne se coagule pas, mais prend une réaction acide après quatre ou cinq jours.

Les effets obtenus sur le cobaye sont très semblables à ceux que l'on observe avec les deux espèces précédentes.

BACILLE DU BEURRE DE PETRI.

Petri (2) l'a rencontré en cherchant le Bacille de Koch dans le beurre. Il inoculait environ 5 centimètres cubes de beurre, liquéfié à l'étuve à 37°, dans le péritoine de cobayes. Les animaux succombent en huit à

(1) Mayer, Zur histologischen Differentialdiagnose der saürefesten Bakterien aus der Tuberkulosegruppe (*Virchow's Archiv*, CLX, 1900, p. 324).

(2) Petri, Zum Nachweis der Tuberkelbacillen in Butter und Milch (*Arb. aus d. Kaiserl. Gesundheitsamte*, XIV, 1898, p. 1).

quinze jours en présentant des lésions assez spéciales : il existe des nodules blanchâtres sur la séreuse; la surface des organes abdominaux est recouverte d'un exsudat plus ou moins abondant, d'aspect pseudo-membraneux; les ganglions mésentériques sont tuméfiés et parfois caséifiés; on trouve de petites granulations grises dans les poumons. Dans les fausses membranes, les nodules, les ganglions, les granulations, l'examen microscopique montre la présence de nombreux Bacilles acido-résistants que l'on peut obtenir en cultures, en ensemençant des parties de ces lésions.

Petri a rencontré ce Bacille dans 52,9 p. 100 des beurres de Berlin et dans 6,3 p. 100 des laits; 32 p. 100 des échantillons de ces beurres, 14 p. 100 de ceux de ces laits renfermaient du Bacille de Koch.

Les éléments ressemblent, comme forme, aspect, disposition, au Bacille de Koch ou au Bacille pseudo-diphtérique; on en trouve souvent qui sont allongés ou ramifiés.

Ils se colorent comme le Bacille de Koch. Souvent cependant, avec la double coloration au bleu, on en trouve qui sont colorés en bleu, ou qui n'ont que certaines parties qui ont conservé le rouge.

Ce Bacille se développe bien à 37°, lentement à la température ordinaire.

Gélose glycérinée. — La culture est humide, blanchâtre ou jaunâtre, passant même au jaune-orange. Elle est déjà bien développée en quarante-huit heures. Avec l'âge, elle se plisse plus ou moins fortement.

Gélatine. — La croissance est très lente, la culture reste minime. La gélatine n'est pas liquéfiée.

Pomme de terre glycérinée. — La culture est abondante, blanche ou grisâtre, humide. Le liquide en excédent est trouble avec un léger voile.

Bouillon. — En vingt-quatre heures à 37°, on a un voile blanc épais qui se plisse plus tard. Le liquide est clair, n'a pas d'odeur ou dégage une odeur ammoniacale. On y trouve un peu d'indol.

Lait. — Le liquide brunit, devient plus ou moins transparent, montre à la surface un anneau et des fragments jaunâtres.

D'après Petri, l'inoculation au cobaye des lésions obtenues comme précédemment ne détermine rien. L'inoculation intrapéritonéale de cultures pures ne détermine quelque chose qu'avec une très grande quantité de produit. Si l'on inocule en même temps du produit de cultures et du beurre stérilisé, on reproduit alors les effets signalés précédemment en usant du beurre commercial; les lésions produites sont en tout semblables.

Le *Bacille du beurre de L. Rabinowitch*, isolé de beurres de Berlin où il a été rencontré en proportion de 33 p. 100, et de Philadelphie (26 p. 100) sans que le Bacille de Koch ait été trouvé une seule fois, est très semblable au Bacille de Petri et doit être identifié avec lui.

Korn a isolé des beurres de Fribourg deux types de Bacilles acido-résistants.

Le *Bacille I de Korn* est moins acido-résistant que le Bacille de Koch. Il pousse sur les milieux ordinaires, bien à 37°, lentement à la température ordinaire. Il forme un peu d'indol.

On obtient les mêmes lésions que précédemment en inoculant, avec le microbe, du beurre stérilisé; sans cette addition, il ne se produit rien ou une toute petite suppuration locale.

Ce Bacille est très voisin du Bacille de Petri.

Le *Bacille II de Korn* paraît être un type bien distinct. Il n'a été rencontré qu'une fois, dans les conditions habituelles. Il végète bien à 37°, pas à la température ordinaire. Les cultures sont jaunes, ou jaune saumoné, rose sale. Son inoculation ne cause rien chez le cobaye et la souris; chez le lapin, l'inoculation donne un abcès au point choisi et dans divers organes des lésions très semblables aux lésions tuberculeuses vraies.

Le Bacille que Coggi (1) a trouvé dans les beurres de Milan est très semblable au Bacille de Petri.

Maria Tobler a isolé des beurres de Zurich cinq types de Bacilles acido-résistants dont certains rappellent le Bacille de Petri, d'autres le Grasbacillus II de Moeller. On les désigne sous les numéros de I à V.

Le *Bacille I de Tobler* a été obtenu en inoculant sous la peau d'un cobaye 5 centimètres cubes de beurre liquéfié à 37°. Il s'est formé un abcès local qui guérit. Dans le pus de l'abcès, se trouvait un Bacille acido-résistant qui se cultiva facilement.

Ce Bacille pousse en deux ou trois jours sur *gélose* à 37°, et forme, après quelque temps, une culture jaune ou orangée; il ne donne presque rien sur la *gélatine* qu'il ne liquéfie pas. Il produit un peu d'indol dans le *bouillon*.

Il est pathogène pour le cobaye et le lapin, où il se comporte comme le Grasbacillus II.

Le *Bacille II de Tobler* a été obtenu en inoculant dans le péritoine d'un cobaye 2 centimètres cubes de beurre liquéfié à 37°. L'animal ayant été sacrifié après soixante-trois jours, on trouva des dépôts pseudo-membraneux sur la séreuse péritonéale et les ganglions mésentériques grossis, à centre ramolli. Dans les fausses membranes et les ganglions se trouvait un Bacille acido-résistant qu'il fut facile de cultiver.

Il donne sur *gélose* une culture blanchâtre ou un peu brunâtre; sur *gélatine*, une culture très minime; dans le *bouillon*, il produit un peu d'indol.

Il est pathogène pour le cobaye et la souris; ses effets rappellent ceux du Bacille de Petri.

Le *Bacille III de Tobler* a été isolé à la suite d'une inoculation de 3 centimètres cubes du dépôt d'un beurre maintenu liquéfié à 37°. L'animal, sacrifié après cinquante et un jours, montrait de grosses granulations dans le péritoine et des granulations miliaires grises dans le foie et la rate. Dans ces lésions, il y avait un Bacille assez faiblement acido-résistant qui s'obtint facilement en cultures.

Sur *gélose* à 37°, la culture prend après quelques jours une teinte rouge-minium ou jaune orangé. Sur *gélatine*, à la température ordinaire, la culture est peu abondante, jaune foncé, ne liquéfiant pas le milieu.

En inoculant du produit de cultures dans le péritoine de cobayes, avec un peu de beurre stérilisé, on obtient la formation d'exsudats abondants et de granulations jaunâtres.

Le *Bacille IV de Tobler* a été obtenu en injectant dans le péritoine d'un cobaye 3 centimètres cubes du dépôt d'un beurre maintenu liquéfié à 37°. Il s'est formé de gros tubercules, à centre ramolli, dans la cavité

(1) Coggi, Sulla presenza di Bacilli tuberkulare mel beurro dimercale di Milano (*Giorn. d. r. Societa ital. d'Igiene*, juillet 1899, p. 289).

péritonéale. Ils renfermaient un Bacille acido-résistant qui a aisément cultivé.

Les cultures sont très semblables à celles du Bacille II; celles sur *gélose* ont une teinte rosée. L'action pathogène est également très voisine.

Le *Bacille V de Tobler* fut isolé en injectant sous la peau d'un cobaye 2 centimètres cubes du dépôt d'un beurre maintenu liquéfié à 37°. Il se forma un abcès local dont le pus contenait le Bacille acido-résistant. Son acido-résistance est faible et disparaît même facilement. Il donne des cultures rosées, qui ressemblent à celles du Bacille III.

Son action pathogène ressemble à celles des espèces précédentes.

Le *Bacille du beurre de Binot* (1) a été isolé d'un beurre de Paris. Inoculé dans le péritoine de cobaye, il y a déterminé des lésions granuleuses et quelques granulations dans le poumon et le rein. Ces lésions renfermaient un Bacille acido-résistant qui s'est cultivé facilement sur milieux glycérinés.

Les cultures se font bien à la température ordinaire, même à 37°.

Sur *gélose glycérinée*, il donne une culture d'abord blanche, puis jaune-paille, enfin orangée à surface verruqueuse ou ridée.

Sur *gélatine*, il forme une strie blanc grisâtre, crémeuse, et ne liquéfie pas.

Sur *pomme de terre glycérinée*, on a une culture abondante, jaune-paille, puis orangée.

Dans le *bouillon glycériné*, il se forme un voile gras, épais, visqueux, devenant orange; le liquide reste clair.

Ce Bacille est pathogène pour le cobaye et la souris blanche; en inoculation péritonéale, il peut causer la mort en une quinzaine de jours, avec des tubercules miliaires dans le foie et la rate.

Il semble voisin du Bacille de Petri.

Le *Bacille du lait de Moeller* (*Milchbacillus*) a été isolé du lait de Belzig, près Berlin, en suivant la technique précédente. On obtint un Bacille acido-résistant à caractères rappelant certains des types déjà connus.

Sur *gélose glycérinée*, la culture, d'abord blanche, passe au jaune, puis à l'orangé avec l'âge.

Sur *gélatine*, la culture est abondante, blanchâtre, plissée, ne liquéfiant pas.

Sur *pomme de terre glycérinée*, la culture, blanche au début, passe au jaune, parfois presque rouge.

Le Bacille est pathogène pour le cobaye en inoculation sous-cutanée et intrapéritonéale. On obtient des lésions semblables aux précédentes.

On voit que tous ces types bacillaires du beurre et du lait présentent entre eux de grandes ressemblances et ne sont pas éloignés non plus des types qui ont été rencontrés dans les excréments d'animaux qui sont peut-être leur véritable milieu d'origine.

Parmi les Bacilles acido-résistants rencontrés chez l'homme ou l'animal, sains ou malades, il en est quelques-uns qui sont particulièrement

(1) Binot, *Loc. cit.*, p. 776.

intéressants à connaître. C'est surtout le Bacille trouvé par L. Rabinowitch dans un cas de gangrène pulmonaire, le Bacille trouvé dans le mucus nasal par Karlinski, le Bacille de la pseudo-tuberculose de la vache de Moeller, le Bacille de la pseudo-tuberculose de l'homme de Flexner, le Bacille de la verruga.

BACILLE DE LA GANGRÈNE PULMONAIRE DE L. RABINOWITCH.

L. Rabinowitch (*loc. cit.*, p. 777) a isolé un Bacille acido-résistant spécial des crachats et du pus d'un homme atteint de gangrène pulmonaire. Des cultures furent obtenues par ensemencement sur milieux ordinaires.

Les Bacilles des crachats ou des cultures sont assez semblables d'aspect aux Bacilles de Koch; une des extrémités est souvent renflée; les vieilles cultures montrent de longs articles filamenteux.

Traités par la méthode de Ziehl-Nielsen, ils résistent aussi bien à la décoloration que les Bacilles de Koch.

Les cultures s'obtiennent facilement.

Sur *gélose glycérinée* à 37° de vingt-quatre à quarante-huit heures, il se forme de petites colonies grisâtres, brillantes, qui confluent en une culture blanche, crémeuse, devenant plus tard sèche et jaune-orange.

Sur *gélatine* à la température ordinaire, le développement est moins abondant; la culture est grisâtre, sèche, puis passe au jaune orange. Le milieu n'est pas liquéfié.

Sur *pomme de terre glycérinée*, la culture est abondante, blanc crémeuse, puis devient jaunâtre.

Dans le *bouillon*, il se fait un voile blanchâtre, plissé: le liquide reste clair.

Dans le *lait*, on a une pellicule jaunâtre; pas de coagulation.

L'inoculation sous-cutanée ou intrapéritonéale au cobaye de produit de culture seul ne détermine rien; en inoculant en même temps du beurre stérilisé, on obtient les mêmes lésions qu'avec le Bacille de Petri dont ce type est très voisin.

BACILLE DU MUCUS NASAL DE KARLINSKI.

Karlinski (p. 778) l'a trouvé dans le mucus nasal de personnes saines ou atteintes de coryza et d'un individu atteint de gomme du nez.

Les frottis, colorés au Ziehl-Nielsen, montrent de nombreux bâtonnets acido-résistants, plus épais et plus courts que le Bacille de Koch. En ensemençant du mucus, on en obtient facilement des colonies.

Le développement se fait au mieux à 37°, mais aussi, plus lentement, à la température ordinaire.

Sur *gélose glycérinée*, la culture est humide, jaune grisâtre, puis devenant plus sombre. Elle dégage une odeur douce, agréable. En ajoutant un peu de beurre au milieu, la culture est plus abondante, jaune orangé.

Sur *gélatine*, la culture est sèche, jaunâtre: le milieu n'est pas liquéfié.

Sur *pomme de terre*, on a une culture assez mince, grise.

Dans le *lait*, il se forme une petite pellicule jaune à la surface : pas de coagulation.

Le Bacille n'est pas pathogène pour le lapin ni pour la souris. L'inoculation intrapéritonéale au cobaye produit des granulations dans le péritoine et quelquefois dans le rein.

BACILLE DE LA PSEUDO-TUBERCULOSE BOVINE DE MOELLER.

Moeller (1) l'a isolé de nodules tuberculeux de bœufs et de porcs. L'ensemencement du contenu nodulaire, fait sur gélose, lui a donné des colonies en quarante-huit heures. Le développement se fait très vite à 37°, en vingt-quatre heures les colonies sont déjà visibles; à la température de la chambre, il se fait encore bien, mais plus lentement.

Sur *gélose glycérinée*, la culture est abondante, crémeuse, parfois très plissée : elle est d'un jaune brillant, quelquefois rougeâtre.

Sur *gélatine*, la culture est abondante, plissée, mate, non colorée.

Sur *pomme de terre glycérinée*, la colonie, assez épaisse, reste grisâtre et plutôt sèche : il ne se fait pas de voile sur le liquide en excédent.

Dans le *bouillon*, il se forme un voile léger blanc grisâtre ; le liquide est trouble.

Dans le *lait*, une pellicule jaunâtre à la surface ; pas de coagulation.

L'inoculation sous-cutanée au cobaye donne un abcès local. La mort survient en huit ou dix jours, sans autres lésions. L'inoculation intrapéritonéale tue l'animal dans un laps de temps analogue ; on trouve la séreuse congestionnée et présentant de petits amas blancs ou jaunâtres contenant de nombreux Bacilles.

BACILLE DE LA PSEUDO-TUBERCULOSE HUMAINE DE FLEXNER.

Flexner (2) a rencontré des microorganismes acido-résistants, à forme de *Streptothrix*, dans des lésions tuberculeuses d'un nègre. Les éléments trouvés, après coloration par la méthode de Gabbet, étaient plutôt filamenteux, ramifiés latéralement, à extrémités renflées en massues; pas de formes bacillaires.

Il n'a pas pu obtenir de cultures.

A rapprocher plutôt des formes d'*Actinomyces* qui offrent souvent une acido-résistance plus ou moins marquée.

Marco del Pont (3) signale un cas de *pseudo-tuberculose* humaine due à un Bacille qui paraît voisin du Bacille I de Tobler ou du *Timotheebacillus*.

BACILLE DE LA VERRUGA PERUANA.

Izquierdo (4) a trouvé des Bacilles acido-résistants dans les verrues

(1) MOELLER, *Rapport au Congrès de Londres*, 1901.
(2) FLEXNER, Pseudotuberculosis hominis streptothrica (*Journ. of exper. Med.*, III, 1898).
(3) MARCO DEL PONT, *Loc. cit.*, p. 749.
(4) IZQUIERDO, Spaltpilze bei der Verruga peruana (*Virchow's Archiv*, 1885, p. 411).

spéciales de cette affection, endémique au Pérou et au Chili, libres dans le tissu ou inclus dans des leucocytes mononucléaires.

Les bâtonnets sont un peu plus gros que ceux du Bacille de Koch ; on trouve aussi des filaments de 20 μ environ.

D'autres observateurs, en particulier Letulle (1), Nicolle (2), Galli-Valerio (3), ont confirmé ces observations ; d'autres ont été moins affirmatifs (4).

Il n'a pas été possible jusqu'ici d'obtenir de cultures.

Si, entre ces différentes espèces, que l'on réunit sous le nom de *Bacilles pseudo-tuberculeux*, et le *Bacille tuberculeux* vrai il existe des différences importantes, on leur trouve, d'un autre côté, de sérieuses ressemblances et de nombreux points de contact. C'est d'abord les mêmes réactions colorantes, des particularités semblables dans la morphologie, certaines similitudes d'aspect des cultures. C'est aussi la propriété que manifestent tous ces Bacilles pseudo-tuberculeux d'être agglutinés, au même titre que le Bacille de Koch, par le sérum des animaux immunisés à l'aide de cultures de ce dernier : inversement, le sérum d'animaux immunisés à l'égard de plusieurs de ces espèces pseudo-tuberculeuses est manifestement agglutinant pour le Bacille de la tuberculose humaine, celui de la tuberculose bovine, celui de la tuberculose aviaire et celui de la tuberculose pisciaire (5). Enfin, la plupart de ces *Bacilles pseudo-tuberculeux* occasionnent chez les animaux, mais dans des conditions déterminées seulement, des modifications pathologiques qui peuvent être considérées, d'une façon générale, comme similaires aux lésions tuberculeuses vraies ; la grande différence réside uniquement dans l'absence de production d'infection, ce qui peut n'être qu'une différence de degré, et dans la terminaison, qui se fait par suppuration, et non par nécrose.

En somme, tous ces *Bacilles pseudo-tuberculeux*, de même que le *Bacille de la lèpre*, comme on le verra plus loin, forment avec le *Bacille tuberculeux* un groupe naturel, où se trouvent des liens de parenté manifestes.

On trouve entre les différents termes des passages évidents. Les différences constatées peuvent être dues à l'adaptation à des conditions de milieu spéciales. Certaines de ces formes proviennent peut-être d'un *Bacille tuberculeux* ayant perdu sa virulence, comme des expériences l'ont déjà montré (p. 703) ; ou bien, le *Bacille tuberculeux* lui-même pourrait être issu de ces formes, à vie saprophytique au début, comme l'a déjà soutenu Ferran (6), dès 1887, ayant acquis, par la suite, les

(1) Letulle. Histologie pathologique de la verrue péruvienne (*Soc. de Biol.*, 16 juillet 1898).

(2) Nicolle, Note sur la bactériologie de la verruga du Pérou (*Ann. de l'Inst. Pasteur*, 1898, p. 591).

(3) Galli-Valerio, Observations microscopiques sur la verruga peruana ou maladie de Carrion (*Centralbl. für Bakt.*, I Abth., Originale, LVIII, 1911, p. 228).

(4) Escomel, Anatomie pathologique du verrucome de Carrion (*Ann. de dermatologie*, novembre 1902). — U. Biffi et Carbajal, Sobre un caso de Enfermetad de Carrion. (*La Cronica medica*. Lima, 1904, p. 285).

(5) Koch, Ueber die Agglutination der Tuberkelbacillen und über die Verwertung dieser Agglutination (*Deutsche med. Wochenschr.*, 1901, n° 48).

(6) Ferran, Études sur le saprophytisme des Bacilles tuberculogènes et sur la vaccination antituberculeuse (*Congrès de la tuberculose*, Paris, 1905).

particularités infectantes qui lui sont spéciales. Il est très difficile d'être affirmatif sur ce point.

PSEUDO-TUBERCULOSES.

On sait que le tubercule, en tant que lésion anatomique, n'est pas l'expression de l'infection de l'organisme par le *Bacille de la tuberculose*, mais simplement l'expression d'une réaction de l'organisme contre certaines irritations. Il existe, en effet, des affections à tubercules qui ne sont nullement sous la dépendance du microbe précité; ce sont elles que l'on désigne sous le nom très général de *pseudo-tuberculoses*.

Ces pseudo-tuberculoses peuvent être dues à des organismes très divers. La plupart sont des parasites; certains sont des Bactéries rondes ou en bâtonnets, causes des *pseudo-tuberculoses microbiennes*; d'autres, des Champignons inférieurs, de véritables Moisissures, causes des *pseudo-tuberculoses mycosiques* ou *aspergillaires*; d'autres des œufs ou larves d'Helminthes, occasionnant les *pseudo-tuberculoses vermineuses*. Enfin des corps inertes même, irritant les tissus, peuvent déterminer aussi de la *pseudo-tuberculose*, provoquant autour d'eux la formation d'un véritable tubercule résultant des processus de défense de l'organisme par les cellules actives.

Les pseudo-tuberculoses des deux dernières catégories se distinguent expérimentalement de la tuberculose vraie en ce qu'elles ne sont jamais inoculables en série. Il n'en est pas de même des autres, des pseudo-tuberculoses microbiennes surtout, qui peuvent très bien présenter ce caractère important.

Pseudo-tuberculoses microbiennes.

Malassez et Vignal (1) ont décrit en 1883, sous le nom de *tuberculose zoogléique*, une maladie qu'ils avaient déterminée chez des lapins et des cobayes, par l'inoculation d'un nodule tuberculeux sous-cutané de l'avant-bras d'un enfant mort de méningite tuberculeuse, dans la matière duquel ils n'avaient pas rencontré le *Bacille de la tuberculose*. Ils obtenaient une véritable tuberculose généralisée amenant la mort de ces animaux au bout de six à dix jours. La maladie se reproduisait identique par inoculation en nouvelle série. Les lésions obtenues étaient des granulations à apparence de tubercules, au centre desquelles se trouvaient des masses irrégulières, vitreuses ou caséeuses. Ces amas, de grosseur variable, atteignant jusqu'à 6 μ de diamètre, étaient constitués par des Zooglées de *Micrococcus* sphériques ou légèrement ovales, mesurant en moyenne de 0,5 à 0,6 μ, disposés souvent par deux ou en longs chapelets onduleux et réunis entre eux par une gangue de gelée transparente. Les auteurs cités ont obtenu des cultures de ces Microcoques sur sérum sanguin, et déterminé, par inoculation de ces cultures à des cobayes et à des lapins, des résultats identiques aux premiers. Mais, à la troisième génération, ils retrouvaient toujours dans les granulations le *Bacille tuberculeux*. Ils en ont conclu que les produits qui avaient servi aux

(1) MALASSEZ et VIGNAL, Sur le microorganisme de la T. zoogléique (*Arch. de physiol.*, 1883 et 1884).

expériences des débuts contenaient quelques *Bacilles tuberculeux* dont l'évolution est beaucoup plus lente que celle du Microcoque; le sujet avait été en butte à deux infections bien distinctes. Les coccus se colorent très bien au traitement par la solution de bleu de méthylène dans l'eau anilinée, suivie de décoloration par le carbonate de soude et l'alcool (p. 384).

Nocard (1) a donné la description d'une tuberculose zoogléique du poumon chez les poules. La maladie sévissait sur tout un poulailler. Les poumons des animaux malades étaient farcis de petites tumeurs d'apparence tuberculeuse, de la grosseur d'un grain de millet à un pois, de consistance ferme et dense. L'examen bactériologique y décela de nombreuses Zooglées semblables à celles décrites par Malassez et Vignal. Ce même observateur (2) a obtenu le développement d'une tuberculose zoogléique en inoculant à des cobayes du produit de jetage d'une vache suspecte de tuberculose; l'inoculation au pigeon donne ici des résultats positifs.

Eberth (3) a observé deux cas de tuberculose à *Micrococcus* chez le cobaye. La *pseudo-tuberculose du lapin* (4), qu'il a décrite, rappelle en tous points l'affection déterminée par Malassez et Vignal, mais les Bactéries sont de courts bâtonnets. Il en est de même de la *pseudo-tuberculose des rongeurs* observée par Pfeiffer (5) chez des cobayes auxquels il avait inoculé des productions tuberculiformes prélevées sur un cheval suspect de morve.

Chantemesse (6) a obtenu une maladie expérimentale identique à celle de Malassez et Vignal, en introduisant dans le péritoine de cobayes, avec toutes les précautions antiseptiques voulues, des fragments d'ouate sur laquelle avaient filtré environ 100 litres d'air d'une salle d'hôpital renfermant un grand nombre de phtisiques.

Les lésions décrites par ce dernier expérimentateur ressemblent à celles obtenues par les premiers cités. C'est surtout la cavité abdominale qui est envahie. Les ganglions du mésentère montrent à leur surface de petites bosselures jaunes; les plus grosses de ces granulations ont le centre formé d'une masse opaque de pus épais. La rate et le foie sont criblés de petits nodules ressemblant à des granulations tuberculeuses. L'intestin n'a rien; les poumons présentent des granulations semblables à celles du foie, mais moins nombreuses. Ces lésions ont, à l'œil et au microscope, l'aspect d'altérations tuberculeuses. En les colorant par le procédé de Malassez et Vignal, ou à l'aide de la solution alcaline de bleu de méthylène de Loeffler, leur centre se montre formé de petites masses de Microcoques semblables à ceux décrits par les premiers auteurs.

Charrin et Roger (7) ont rencontré une autre pseudo-tuberculose sur un cobaye mort spontanément : le foie et la rate étaient remplis de granulations miliaires tout à fait analogues à celles de la tuberculose. Par

(1) Nocard, *Recueil de méd. vétér.*, mai 1885.

(2) Nocard, T. zoogléique d'origine bovine (*Soc. de Biol.*, 9 mars 1889).

(3) Eberth, Zwei Mycosen des Meerschweinchen (*Virchow's Arch.*, C, 1885, p. 23).

(4) Eberth, Pseudo-T. des Kaninchens (*Fortschr. der Med.*, 1885, p. 179).

(5) Pfeiffer, Ueber die bacilläre Pseudotuberkulose bei Nagethieren. Leipzig, 1889.

(6) Chantemesse, La T. zoogléique (*Ann. de l'Inst. Pasteur*, I, 1887, n° 3, p. 97).

(7) Charrin et Roger, Sur une pseudo-T. bacillaire (*C. R. de l'Acad. des sc.*, CVI, 1888, p. 868).

ensemencement dans de la gélatine ordinaire, il se développa des colonies; rien au contraire n'apparut dans de la gélatine glycérinée. Les colonies obtenues étaient de petite taille, blanchâtres, ne liquéfiant pas la gelée. Le microbe se développe facilement aussi sur la pomme de terre, sur la gélose et dans le bouillon.

Les cultures sur gélatine contiennent un petit Bacille mobile, n'atteignant pas 1 μ de long. Il s'allonge un peu dans le bouillon et atteint jusqu'à 2 μ et 2,5 μ sur pomme de terre. Dans les bouillons additionnés d'antiseptique, on observe de longs filaments.

Les cultures inoculées aux animaux reproduisent la maladie primitive. La maladie est très nettement inoculable en série.

Dor (1) a décrit une pseudo-tuberculose probablement identique à la précédente.

Courmont a rencontré, dans des tubercules pleuraux d'une vache qui paraissait atteinte de tuberculose ordinaire, une Bactérie différente du Bacille tuberculeux de Koch, reproduisant, par inoculation au cobaye, des tubercules en tout semblables à ceux de la tuberculose proprement dite (2).

Le sang et les produits tuberculeux lui donnèrent très aisément des cultures pures de ce Bacille. Par contre, l'étude microscopique, avec les méthodes de coloration habituelles, ne décela la présence d'aucun Bacille de Koch.

Ce microbe végète très bien sur tous les milieux ordinaires, glycérinés ou non. On en obtient encore de très belles cultures à + 46°. Le bouillon se trouble en vingt-quatre heures, puis laisse déposer en vieillissant un sédiment blanc jaunâtre. La gélatine n'est pas liquéfiée; la culture forme à la surface une mince tache, irisée, à bords réguliers, et se prolonge dans la piqûre où l'on observe de petites colonies sphériques. Sur pomme de terre, il se développe une couche crémeuse couleur café.

Les cultures récentes tuent rapidement les cobayes et ne déterminent pas de tubercules; mais, lorsqu'elles sont vieilles de dix-neuf jours environ, elles rendent les cobayes tuberculeux en cinq jours.

Les jeunes tubercules réinoculés à d'autres cobayes, en séries, reproduisent la maladie. Les animaux meurent dans un laps de temps qui varie de cinq à douze jours. Le microbe en question a toujours été retrouvé dans les tubercules et dans le sang du cœur, à l'exclusion de celui de Koch.

Dans les bouillons, ce microbe a la forme d'un bâtonnet court et large, deux fois plus long que large, à extrémités arrondies. Les bâtonnets sont très mobiles et ne se disposent jamais en chaînettes. Sur les milieux solides, les dimensions sont un peu moindres.

Tous les réactifs colorants donnent facilement des résultats; la décoloration du microbe se fait très vite. Les méthodes employées pour le Bacille de la tuberculose ne peuvent pas servir. Ce sont là des caractères qui rappellent bien ceux du *Colibacille*.

Pour Grancher et Ledoux-Lebard (3), toutes ces pseudo-tuberculoses

(1) Dor, Pseudo-T. bacillaire (*C. R. de l'Acad. des sc.*, CVI, 1888, p. 1027).

(2) L. Courmont, Sur une T. microbienne et particulière du bœuf (*C. R. de la Soc. de Biol.*, 16 mars 1889).

(3) Grancher et Ledoux-Lebard, Recherches sur la T. zoogléique (*Arch. de méd. expér.*, I, 1889, p. 603). Et : Deuxième mémoire (*Ibid.*, II, 1890, p. 589).

doivent être rapportées à la tuberculose zoogléique de Malassez et Vignal. C'est encore la même affection que ces expérimentateurs ont rencontrée chez un cobaye mort quatre ou cinq jours après avoir reçu une injection d'eau stérilisée ayant filtré sur de la terre à la surface de laquelle avait été répandu du produit de cultures sur gélose glycérinée du Bacille de Koch. Des ensemencements sur gélose glycérinée faits avec le foie ou la rate de cobayes malades donnèrent très facilement des cultures.

Zagari (1) a observé cette pseudo-tuberculose évoluant naturellement chez le cobaye.

Parietti (2) l'a obtenue en inoculant du lait à des cobayes.

Du Cazal et Vaillard (3) ont très probablement observé cette même affection chez l'homme. Le sujet présentait à l'autopsie, sur presque toute l'étendue de la séreuse péritonéale et dans le pancréas, une éruption de petits nodules spéciaux, d'aspect caséiforme, contenant des Bacilles courts se décolorant par la méthode de Gram, liquéfiant la gélatine, pathogènes pour le lapin et la souris, inoffensifs chez le cobaye, même à doses élevées. L'injection intraveineuse d'un centimètre cube d'une culture récente dans le bouillon tue le lapin en deux jours, avec des accidents septicémiques; à dose moindre, un demi-centimètre cube, il se produit, au contraire, une infection à marche chronique, caractérisée par l'apparition, en divers points du corps, de petits nodules caséiformes semblables à ceux observés sur le malade.

Legrain (4) a aussi obtenu une *pseudo-tuberculose bacillaire* chez le lapin par inoculation de crachats de phtisiques. Le microbe observé était également un court Bacille se décolorant par la méthode de Gram, liquéfiant la gélatine, tuant les lapins par septicémie lorsqu'il était inoculé à fortes doses, déterminant, au contraire, une véritable pseudo-tuberculose à doses minimes.

Preicz (5) regarde la plupart de ces pseudo-tuberculoses comme identiques et produites par une même espèce microbienne; il propose de leur appliquer la dénomination de *pseudo-tuberculose des rongeurs*, déjà adoptée par Pfeiffer et Kutscher (6). Le Bacille obtenu par Du Cazal et Vaillard, puis revu par Legrain, est probablement différent de cette première espèce; il s'en distingue surtout en ce qu'il liquéfie la gélatine et n'est pas pathogène pour le cobaye. Le Bacille décrit par J. Courmont en 1889 est peut-être aussi une autre espèce, tandis que celui décrit par J. Courmont et Nicolas (7), provenant d'une vache supposée tuberculeuse, lui paraît bien identique à la première.

(1) Zagari, Sulle cosi della tuberculosa zoogleica (*Centralbl. für Bakt.*, VIII, 1890, p. 208).

(2) Parietti, Eine Form von Pseudo-Tuberkulose (*Centralbl. für Bakt.*, VIII, 1890, p. 577).

(3) Du Cazal et Vaillard, Sur une maladie parasitaire de l'homme (*Ann. de l'Inst. Pasteur*, V, 1891, p. 353).

(4) Legrain, *Bull. med.*, 1891, p. 1019.

(5) Preicz, Recherches comparatives sur les pseudo-T. bacillaires (*Ann. de l'Inst. Pasteur*, VIII, 1894, p. 231).

(6) Kutscher, *Zeitschr. für Hygiene*, XVIII, 1894, p. 327.

(7) J. Courmont et Nicolas, Sur une T. strepto-bacillaire d'origine bovine (*Arch. de parasitol.*, I, 1898, p. 123).

C'est toujours la même espèce qui a été rencontrée chez le lapin par Lucet (1).

Le même Bacille a encore été signalé par Charrin et Gouget (2) chez le lapin, où il présentait une curieuse localisation à l'appendice, déterminant une appendicite pseudo-tuberculeuse (3). Il a été retrouvé chez l'homme par P. Courmont et Tixier (4) dans un cas d'arthrite hémorragique du coude. C'est également la même espèce que Sabrazès (5) a rencontrée chez le rat d'égout.

C'est encore cette même espèce que Galavielle (6) a rencontrée dans un cas de pseudo-tuberculose du chat.

Nous allons donner les principaux caractères de cette première espèce, qu'on peut dénommer *Bacille de la pseudo-tuberculose zoogléique*.

BACILLE DE LA PSEUDO-TUBERCULOSE ZOOGLÉIQUE.

Morphologie. — Les Bacilles des jeunes cultures dans le bouillon sont des bâtonnets de 1 μ à 2 μ de long, à extrémités arrondies, isolés et nettement mobiles, ou, au contraire, en chaînettes et alors plus courts et immobiles. Cette disposition en chaînettes leur a fait appliquer le nom de *Streptobacilles* par Dor. Les éléments des cultures âgées ont une longueur moindre et sont souvent ovalaires. Ils prennent facilement les matières colorantes et se *décolorent* par la méthode de Gram ; ils se décolorent complètement par la méthode d'Ehrlich. Les Bacilles des coupes des nodosités se colorent très difficilement.

Cultures. — Le *bouillon* est fortement troublé en dix-huit heures ; il se forme des flocons blanchâtres sur les parois et au fond du vase. Au bout de quelques jours, tout se sédimente et le liquide s'éclaircit. Il ne donne jamais la réaction de l'indol.

Sur *gélatine*, le microbe pousse à la température ordinaire ; il *ne liquéfie jamais* ce milieu. En *piqûre*, il donne une culture blanchâtre, en clou, à tige peu développée. En *strie*, il se forme une traînée blanchâtre, peu épaisse.

Sur *gélose* en *strie*, on obtient une large bande, d'un blanc sale, luisante, pas visqueuse. L'addition de glycérine donne des cultures plus abondantes. Les vieilles cultures dégagent une odeur assez forte, désagréable.

Sur *sérum coagulé*, la culture est semblable à celle sur gélose, mais moins abondante.

Sur *pomme de terre*, elle est blanc jaunâtre.

Inoculation expérimentale. — L'inoculation sous-cutanée ou intra-

(1) Lucet, Sur un nouveau cas de T. strepto-bacillaire chez le lapin (*Arch. de parasitol.*, I, 1898, p. 100, et II, 1899, p. 127).

(2) Charrin, Une appendicite de l'animal (*Soc. de Biol.*, 27 février et 13 mars 1897). — Gouget, Pseudo-T. ; localisation élective sur l'appendice (*Ibid.*, 3 avril 1897).

(3) Josué, Appendicites expérimentales par infection sanguine (*Soc. de Biol.*, 13 mars 1897).

(4) P. Courmont et Tixier, T. strepto-bacillaire (*Soc. des sc. méd. de Lyon*, 1er décembre 1897). — P. Courmont, Sur une forme nouvelle de T. strepto-bacillaire d'origine humaine (*Arch. de méd. expér.*, janvier 1898).

(5) Sabrazès, Pseudo-T. strepto-bacillaire du surmulot (*Ann. de l'Inst. Pasteur*, XVI, 1902, p. 97).

(6) Galavielle, Un cas de Pseudo-T. chez les félidés (*Congrès de méd. de Montpellier*, 1898). — Id., Un cas de T. d'origine féline (*Soc. de Biol.*, 13 mai 1898, p. 492).

péritonéale tue le cobaye en cinq à six jours, avec des lésions tuberculeuses, surtout développées dans le foie ou la rate. L'ingestion de cultures détermine aussi bien l'infection.

Le lapin peut mourir rapidement, en quelques jours, après une inoculation intraveineuse de cultures jeunes, sans autres lésions qu'une forte hyperémie de la rate et du foie. Les cultures vieilles n'amènent la mort que beaucoup plus tard (vingt jours et plus) avec nodules tuberculeux dans le foie, la rate, l'intestin. L'injection intrapéritonéale cause la mort plus rapidement.

Dans le cas de mort rapide, on trouve dans le foie de gros amas bacillaires, de véritables Zooglées qui se teignent en bleu foncé par le bleu de Kühne. Ces Zooglées sont formées de nombreux Bacilles, courts ou ovoïdes, unis bout à bout en longs filaments enchevêtrés; certaines occupent les capillaires des lobules, d'autres envahissent les travées hépatiques.

Après quelques passages dans l'organisme, le microbe ne forme plus de Zooglées si spéciales, mais ne pullule dans les tissus qu'en éléments isolés ou réunis en petit nombre.

Les pseudo-tubercules paraissent être surtout formés par des cellules migratrices. Ils peuvent contenir des amas zoogléiques ou simplement des Bacilles isolés ou en courtes chaînettes; parfois même on ne peut y rencontrer aucun microbe.

Le chien est à peu près réfractaire; le moineau l'est complètement. Le pigeon et le rat blanc ne présentent que des lésions locales.

Ledoux-Lebard (1) signale l'agglutination très nette des cultures en bouillon de ce Bacille, en mélangeant neuf parties de bouillon de culture à une partie de sérum du sang d'un lapin soumis à son inoculation.

On a signalé d'autres espèces bacillaires qui possèdent aussi la propriété de produire chez les animaux des lésions tuberculeuses. Certaines présentent quelques ressemblances avec le *Bacille tuberculeux* vrai, mais peuvent quand même s'en distinguer aisément par leurs caractères de forme ou de cultures; d'autres sont nettement différentes.

Preicz (2) a isolé une autre espèce bacillaire d'une *pseudo-tuberculose du mouton*. C'est un Bacille court et mince, immobile, se *colorant* par la méthode de Gram. Il ne pousse pas sur gélatine à la température ordinaire et végète au mieux sur sérum coagulé, où il donne de petites colonies arrondies d'une couleur jaune d'or. Il est pathogène pour le lapin et le cobaye et produit des lésions semblables à celles qu'occasionne le microbe précédemment décrit. Les pseudo-tubercules formés peuvent subir la calcification avec l'âge.

Cette Bactérie (*Bacille de la suppuration caséeuse*, *Bacille de Preicz-Nocard*), très polymorphe, se retrouverait, d'après Nocard (3), dans la lymphangite ulcéreuse du cheval et dans une forme de dermite pustu-

(1) Ledoux-Lebard, De l'action du sérum pseudo-T. sur le Bacille de la pseudo-T. (*Ann. de l'Inst. Pasteur*, XI, 1897, p. 909)

(2) Preicz, Rech. comp. sur les pseudo-T. bacillaires et une nouvelle espèce de pseudo-T. (*Ann. de l'Inst. Pasteur*, VIII, 1894, p 231).

(3) Nocard, Sur une lymphangite ulcéreuse simulant le farcin morveux chez le cheval (*Ann. de l'Inst. Pasteur*, X, 1896, p. 609).

leuse de ce même animal. D'après Carré et Bigoteau (1), elle jouerait un très grand rôle en pathologie ovine, où beaucoup d'affections suppurantes seraient sous sa dépendance; elle serait la cause des *eaux-rousses* ou *mal rouge* du mouton, confondue avec le charbon, et surtout de la *cachexie aqueuse*, si fréquente chez cet animal, attribuée généralement à la présence de Douves dans le foie.

Le microbe serait pathogène pour le mouton, le cheval, le porc, le singe et même l'homme.

Vallée (2) décrit une *pseudo-tuberculose du veau* due à un Bacille qui se colore bien par la méthode de Gram et dont les cultures reproduisent, par inoculations, des lésions identiques à celles dont il provient. Le microbe viendrait du lait, car l'alimentation au lait bouilli a suffi pour faire disparaître la maladie qui sévissait sous forme épidémique.

J. Courmont (3) a observé deux cas de pseudo-tuberculose humaine due à un Bacille voisin de celui de la pseudo-tuberculose du cobaye, s'en distinguant en ce qu'il végète abondamment sur carotte, sur artichaut et dans le lait, tandis que le Streptobacille du cobaye ne pousse pas du tout sur ces milieux.

On a décrit plusieurs cas de pseudo-tuberculoses humaines dus aux *Actinomyces*, *Cladothrix*, *Streptothrix*. Flexner (4), Massaglia (5) en ont observé des cas typiques (Voy. p. 792).

Enfin, on a vu (p. 781) que les *Bacilles pseudo-tuberculeux* pouvaient aussi déterminer expérimentalement des lésions semblables à celles de la tuberculose vraie; il est possible que l'on rencontre des pseudo-tuberculoses dues à l'un ou l'autre d'entre eux.

Pseudo-tuberculoses mycosiques.

On connaît surtout la *pseudo-tuberculose aspergillaire*, produite par une Moisissure commune partout, l'*Aspergillus fumigatus*, Champignon de l'ordre des Ascomycètes.

Cette Moisissure, commune sur les substances végétales altérées, forme sur bien des milieux nutritifs des taches verdâtres ou gris bleuâtre, dont la nuance est due aux nombreux appareils à spores conidiennes s'élevant du mycélium. Ces appareils, assez courts, se terminent par un renflement hémisphérique muni de nombreux petits stérigmates pointus, portant chacun une spore conidienne ronde, de 2,5 μ à 3 μ de diamètre, à parois lisses, très faiblement colorées.

L'affection présente cliniquement les caractères d'une vraie tuberculose, à marche lente, chronique. On ne l'observe que chez les individus qui font profession de *gaver* les pigeons aux marchés. Ces *gaveurs de pigeons* se remplissent la bouche d'un mélange d'eau et de grains

(1) Carré et Bigoteau, Le Bacille de Preisz-Nocard en pathologie ovine (*Revue gén. de méd. vétér.*, 1er et 15 avril 1908).

(2) Vallée, Une nouvelle pseudo-T. (*Congrès pour l'étude de la T.*, Paris, 1898).

(3) J. Courmont, Sur les T. humaines dues à des Bacilles autres que les Bacilles de Koch (*Congrès pour la lutte contre la T.*, Berlin, 1899).

(4) Flexner, Pseudo-tuberculosis hominis streptothrica (*John's Hopkins Hospital Bulletin*, 1897, n° 75).

(5) Massaglia, Un caso di pseudo-tuberculosi actinomycotica (*Giorn. di reale Academia di med. di Torino*, vol. X, 1904).

de blé et l'insufflent dans le bec entr'ouvert des pigeons (1). L'infection vient certainement de l'absorption des spores très fréquentes sur le blé.

L'examen des crachats ne montre pas de *Bacilles de la tuberculose*, mais des filaments mycéliens et parfois des spores d'*Aspergillus fumigatus*. Les cultures en milieux appropriés, en liquide de Raulin particulièrement, permettent d'obtenir facilement cette espèce.

Divers observateurs ont reproduit expérimentalement l'affection chez les animaux par injection intraveineuse de spores du Champignon (2). Les spores, arrivées dans le poumon ou le foie, sont rapidement entourées de leucocytes et absorbées par des cellules géantes. Elles germent et donnent de petites rosettes de mycélium pouvant rappeler la forme des nodules radiés d'*Actinomyces*, autour desquelles se forme le tubercule de la façon habituelle. Ce tubercule peut passer par les différents stades que l'on connaît, se caséifier et donner lieu à la production de cavernes. Les recherches de Kotliar font penser que le Champignon agit surtout mécaniquement, et non par formation de produits solubles actifs.

J'ai pu observer, chez l'homme, plusieurs cas de pseudo-tuberculose mycosique, avec absence complète de Bacille de Koch, et présence dans les crachats de très nombreux filaments mycéliens donnant des cultures pouvant être attribuées à une espèce du genre *Oïdium* : c'est une *pseudo-tuberculose à oïdium*.

Pseudo-tuberculoses vermineuses.

Laulanié (3) a décrit une tuberculose pulmonaire du chien due à des œufs d'un Strongle, le *Strongylus vasorum*. On a aussi signalé chez le chat des tubercules du poumon produits par des œufs ou des larves des Nématodes (4). Ebstein et Nicolaier (5) ont observé, autour des larves, la formation de véritables tubercules, composés, chez le chien, de cellules épithélioïdes seules, associées avec des cellules géantes chez le chat.

BACILLUS LEPRÆ A. Hansen.

(*Bacille de la lèpre, Bacille de Hansen.*)

A. Hansen (6) a signalé dans les tissus lépreux la présence d'un Bacille qu'il considérait comme spécifique. Cette même Bactérie a été étudiée

(1) Dieulafoy, Chantemesse et Widal, *Congrès de Berlin*, 1890, et *Gaz. des hôp.*, 1890, p. 821.

(2) Rénon, Recherches sur la pseudo-T. aspergillaire. Thèse de Paris. 1893. — Kotliar, Contribution à l'étude de la pseudo-T. aspergillaire (*Ann. de l'Inst. Pasteur*. VIII, 1894, p. 479).

(3) Laulanié, Sur quelques affections parasitaires du poumon et leurs rapports avec la T. (*Arch. de physiol.*, IV. 1864, p. 487).

(4) Leuckart, Die menschlichen Parasiten.

(5) Ebstein et Nicolaier, *Virchow's Archiv*, CXVIII, 1889, p. 432.

(6) Hansen, *Arch. de physiol. belges*. 1877. et *Virchow's Archiv*, LXXIX.

par d'autres observateurs, particulièrement Neisser (1), Leloir (2), Unna (3), Babès (4), qui en ont complété l'histoire.

Dans la peau, au niveau des tubercules lépreux récents, au-dessous de l'épiderme resté normal, on trouve le derme infiltré de grosses cellules rondes remplies de Bacilles (fig. 271). On pourrait constater leur présence dans le sang, où ils sont libres ou enfermés dans les globules blancs. Ils sont nombreux dans les parties envahies, surtout dans le testicule, la rate, le foie, les ganglions lymphatiques. Sudakewitsch (5), Uhlenhuth et Westphal (6) en ont décrit dans l'intérieur des cellules nerveuses dans des cas de lèpre anesthésique.



Fig. 271. — Granulome de la lèpre. *a*, épiderme ; *b*, cellules lépreuses remplies de Bacilles; *c*, amas de Bacilles (d'après Rindfleisch).

MORPHOLOGIE

Caractères microscopiques et coloration. — Ce sont de fins bâtonnets mesurant en moyenne de 5 μ à 6 μ de longueur, sur une largeur de moins de 1 μ, rarement droits, plus souvent légèrement courbés (fig. 272). La plupart des observateurs les considèrent comme tout à fait immobiles; Babès (7) les donne comme légèrement mobiles. Beaucoup présentent une zone gélatineuse périphérique hyaline, ne se colorant pas, une sorte de capsule. L'aspect est très semblable à celui du *Bacille de la tuberculose*; ils sont toutefois un peu plus courts et un peu moins grêles. Ils se colorent aussi bien que lui par la méthode d'Erhlich, mais facilement aussi avec les solutions aqueuses ordinaires, ce que ne fait pas le premier; ils *restent colorés* par la méthode de Gram. De plus, ils résistent mieux encore aux décolorants; d'après Babès, l'acide azotique au tiers ne les a pas décolorés après une heure, tandis qu'au bout de ce temps les Bacilles de la tuberculose sont toujours décolorés ; d'où possibilité de distinguer facilement ces deux espèces et d'en obtenir des doubles colorations. Dans les Bacilles colorés, on observe fréquemment des vacuoles irrégulières, semblables à celles que présente le *Bacille de la tuberculose*; ils paraissent parfois granuleux, avec alternance de points rouge sombre et de points clairs; ou bien les deux extrémités seules se colorent bien et sont séparées par un espace clair. Il se forme fréquemment, surtout aux extrémités, des renflements que l'on a considérés comme des spores. Ces renflements, mesurant 2 μ de diamètre, sont au

(1) Neisser, Histologische und bacteriologische Lepraumtersuchungen (*Virchow's Archiv*, CIII, 1886.

(2) Leloir, Traité prat. et th. de la lèpre, 1886.

(3) Unna, Zur Histol. der leprösen Haut (*Monatshefte für Derm.*, 1885).

(4) Babès, Der Leprabacillus und die Histologie der Lepra. Berlin, 1898.

(5) Sudakewitsch, Beiträge zur pathol. Anat. der Lepra, 1887.

(6) Uhlenhuth et Westphal, Histologische und bakteriologische Untersuchungen über einen Fall von Lepra tuberoso-anesthetica mit besonderer Berücksichtigung des Nervensystem (*Centralbl. für Bakt.*, XXIX. 1901, p. 233).

(7) Babès, Observ. sur les Bacilles de la lèpre (*C. R. de l'Acad. des sc.*, 30 avril 1883, et *Arch. de physiol.*, 1883).

nombre de deux ou trois; dans le premier cas, ils sont situés aux extrémités d'un bâtonnet qui prend une forme en haltère.

Barannikow (1) décrit des formes de coccus, des formes très allongées, en massues, ramifiées, qui pourraient toutes s'observer dans les tissus lépreux.

Deux caractères paraissent importants ici : c'est la grande abondance des Bacilles dans la plupart des cas et leur situation en amas.

Cultures. — Divers observateurs ont isolé des tissus lépreux des Bactéries diverses données par certains comme *Bacille de la lèpre* vrai, par d'autres comme espèces différentes. Il semble bien que le plus souvent ce ne soit pas du véritable *Bacille de la lèpre*, mais d'autres microbes acido-résistants qui peuvent, comme on l'a vu page 777, se trouver facilement dans les produits que l'on examine. La preuve expérimentale n'a pas été donnée jusqu'ici, pour la raison qu'on n'a réussi qu'exceptionnellement d'inoculation de lèpre chez les animaux. Spronck croyait pouvoir être affirmatif en annonçant l'action agglutinante du sérum de lépreux sur le Bacille qu'il a isolé et qui paraît semblable à ceux obtenus dans les mêmes conditions par Bordoni-Uffreduzzi, Babès, Lévy et Czaplewski; mais on sait que la propriété agglutinante est souvent un caractère de groupe et ne peut pas être regardée comme véritablement spécifique.



Fig. 272. — Bacilles de la lèpre.

Neisser a décrit des cultures sur sérum sanguin coagulé, réussies en immergeant dans la surface de la gelée un fragment de peau lépreuse; il obtient de minimes cultures, qui, reportées sur blanc d'œuf cuit, donnent après trois semaines de petites colonies proéminentes,

(1) Barannikow, Beitrag zur Bakteriologie der Lepra (*Centralbl. für Bakt.*, XXIX, 1901, p. 781).

de la grosseur d'un grain de millet, entourées d'une zone marginale hyaline.

Bordoni-Uffreduzzi (1) dit avoir obtenu des cultures en usant des milieux glycérinés. On peut se rendre compte qu'il a pu cultiver du *Bacille de la tuberculose* qui vit souvent avec le *Bacille de la lèpre*.

D'après lui, la culture du microbe qu'il a isolé de lésions lépreuses est très lente; comme pour l'espèce précédente, elle ne se fait qu'à une température élevée, au mieux à 37°-38°, et a les caractères suivants :

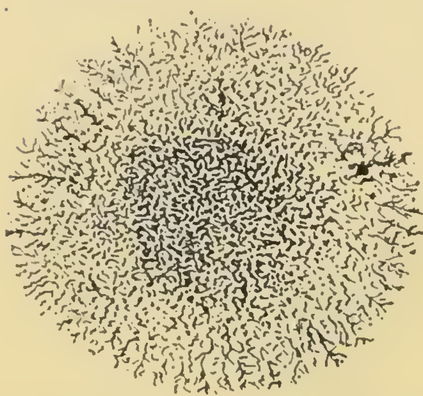


Fig. 273. — Colonie de *Bacille de la lèpre*, développée sur plaque de gélose. 200/1 (d'après Bordoni).

Sur *sérum glycériné et peptonisé* à 37°, il se forme lentement une colonie rubanée, à bords sinueux, de teinte légèrement jaunâtre. Le milieu n'est jamais liquéfié. Lorsqu'il existe du liquide dans la partie déclive du tube, la culture s'y développe un peu en laissant le liquide clair.

Sur *gélose glycérinée*, à 37°, il se développe, le long de la strie, de petites colonies rondes, grisâtres, à bords dentés, pouvant confluer après un temps très long. Il peut se produire une colonie compacte, comme la précédente, lorsqu'on se sert d'une grande quantité de substance d'inoculation.

Sur plaques de gélose glycérinée, on obtient à 37° de petites taches floconneuses, arrondies, grisâtres, plus compactes au centre, formées de filaments sinueux disposés en fins réseaux (fig. 273).

Des premières cultures ne se développent jamais sur *gélatine* ou sur *pomme de terre*; celles des générations suivantes y croissent. Il se forme sur gélatine, de 20° à 25°, de petites colonies rondes isolées, à la surface et dans le canal de piqûre. La gelée ne semble pas être liquéfiée.

Ducrey (2) dit avoir obtenu des cultures sur *gélose glucosée*. En ensemençant des produits lépreux en piqûre profonde, il a observé le développement de petites colonies punctiformes blanchâtres, le long du trajet de la piqûre, jusqu'à 2 ou 3 centimètres de la surface. Ces colonies peuvent se cultiver dans le bouillon à l'abri de l'air : elles y forment un voile fragile. Ce serait une Bactérie anaérobie, bien différente dès lors de la forme décrite par Bordoni-Uffreduzzi et ne paraissant avoir aucun rapport avec le *Bacille de la lèpre*.

Babès (3) obtint de tissus lépreux, en 1890, des cultures sur *sérum* et sur *gélose* et signale pour les Bacilles de la peste la faculté de rester colorés par la méthode d'Ehrlich. Il constate les ressemblances de Bacilles de ces cultures avec le *Bacille de la diphtérie*, le *Bacille pseudo-diphtérique* et le *Bacille du xérosis*.

C'est très probablement le même microbe que Lévy (2) décrit comme

(1) Bordoni-Uffreduzzi, Ueber die Cultur der Leprabacillen (*Zeitschr. für Hygiene*, III, 1887, p. 178).

(2) Ducrey, *Giorn. ital. delle mal. vener. e della pelle*, 1892.

(3) Babès, *in* Cornil et Babès, Les Bactéries, 1890. — Ueber die Kultur der von mir bei Lepra gefundenen Diphteridie (*Centralbl. für Bakt.*, XXV, 1897, p. 125).

(4) Lévy, Ein neues um einem Fall von Lepra gezüchtetes Bakterium aus der Klasse der Tuberkelbacillen (*Arch. für Hygiene*, XXX, 1897, p. 168).

espèce nouvelle, voisine du *Bacille tuberculeux* et présentant certaines ressemblances avec l'*Actinomyces* et les *Streptothrix*.

Czaplewski (1), en ensemençant sur *sérum coagulé* de la sécrétion nasale et du raclage d'une nodosité pharyngienne ulcérée d'un lépreux, obtint, parmi de nombreuses colonies de *Staphylocoque doré* et de *Bacille de Friedlaender*, de petites colonies d'un gris jaunâtre, irrégulièrement arrondies, constituées par un fin Bacille sinueux, rappelant par l'aspect et les dimensions le *Bacille de la lèpre*.

Ce microbe se cultive facilement sur tous les milieux habituels, sauf sur *pomme de terre*. Le *sérum de Loeffler* lui est particulièrement



Fig. 274. — Bacille isolé dans un cas de lèpre par Czaplewski ; culture d'un jour sur sérum de Loeffler. 1000/1.

favorable. L'addition de glycérine au sérum et à la gélose est une très bonne condition. La *gélatine* n'est pas liquéfiée. Le *bouillon* est à peine troublé et ne donne qu'un minime dépôt pulvérulent.

Les Bacilles jeunes se colorent très bien aux colorants ordinaires, difficilement toutefois au bleu de méthyle. Ils restent colorés par la méthode de Gram. Ils présentent une certaine résistance à la décoloration par l'alcool et les acides minéraux, mais cette résistance est moins forte que celle du *Bacille de la tuberculose*. La forme et les dimensions de ces Bacilles de jeunes cultures sont assez régulières (fig. 274).

Dans les cultures vieilles, les Bacilles sont granuleux, se colorent mal et irrégulièrement; le corps des éléments présente souvent des renflements et des étranglements alternatifs irréguliers, rappelant ce qui se voit souvent avec le *Bacille tuberculeux*, l'aspect auquel Unna a donné le nom de *Coccothrix* (fig. 275). Ces vieux Bacilles se colorent souvent

(1) Czaplewski, Ueber einem aus einen Leprafalle gezuchteten alcohol-und säure-festen Bacillus aus den Tuberkelbacillengruppe (*Centralbl. für Bakt.*, XXIII, 1898, p. 97 et 189).

comme les *Bacilles de la diphtérie* à la coloration de Neisser. Ils se décolorent plus facilement que les Bacilles jeunes.

Dans le bouillon, ce microbe montre de nombreuses formes d'involution. On trouve des éléments renflés au milieu ou à une extrémité, de véritables sphères; certains sont en Y ou sont réellement ramifiés.

En aucun cas, quels que soient l'animal et le mode d'inoculation employés, Czaplewski n'a pu constater d'action pathogène.

Spronck (1) a obtenu des premières cultures d'un microbe assez faiblement acido-résistant en ensemençant des *pommes de terre glycérinées*



Fig. 275. — Bacille isolé dans un cas de lèpre par Czaplewski ; culture de vingt-trois jours sur sérum de Loeffler. 1000/1.

et neutralisées avec du tissu broyé de tubercules lépreux non ulcérés et de la moelle osseuse de lépreux.

Les colonies ne s'aperçoivent qu'au bout de dix jours, à 38°. Elles restent très petites; il faut un examen minutieux pour les trouver. Ce sont de petites colonies d'un jaune pâle, situées autour des parcelles de matière d'ensemencement. Elles sont formées de bâtonnets un peu plus gros et un peu plus longs que ceux des lésions lépreuses, se décolorant plus rapidement à la méthode d'Ehrlich, rappelant comme forme et arrangement le *Bacille de la diphtérie* et le *Bacille pseudo-diphtérique*.

Ces colonies se réensemencent facilement sur divers milieux, mais pas du tout sur pommes de terre, même identiques aux premières. L'addition de 5 p. 100 de glycérine ou 2 p. 100 de glucose favorise un peu le développement. Il n'y a pas de croissance à la température de la chambre : la végétation commence vers 25°, elle est abondante à 37°.

Les cultures sur *sérum* sont jaunâtres. Celles sur *gélose* toujours inco-

(1) Spronck, La culture du Bacille de Hansen et le séro-diagnostic de la lèpre (*Sem. méd.*, 28 sept. 1898).

lores, arrondies, mais à contours irréguliers d'où partent des arborisations; elles présentent souvent des granulations disséminées rappelant celles des colonies du *Spirille du choléra* sur plaques de gélatine.

Il n'y a pas ou presque pas de végétation dans les *bouillons de viande* ou les *sérums* liquides. Par contre, le *bouillon de poisson*, de cabillaud ou de turbot, par exemple, est un excellent milieu ; il s'y forme un précipité visqueux, filamenteux, adhérant aux parois du vase. La *décoction de levure*, le *lait* sont également de bons milieux.

Les colonies se développent, mais moins abondamment, dans une atmosphère privée d'oxygène.

Les Bacilles de ces cultures sont immobiles et ne semblent pas donner de spores.

Ces cultures n'ont montré de pouvoir pathogène pour aucun des animaux d'expérience.

Lorsqu'on traite une culture sur gélose par la liqueur de Flemming, elle ne noircit pas, mais devient tout au plus légèrement brunâtre. Ce fait indique que dans ces cultures il ne se forme pas ou très peu de matière grasse ou cireuse, qui, comme pour le *Bacille de la tuberculose*, donne au *Bacille de la lèpre* ses réactions colorantes spéciales, et concorde avec la faible résistance à la décoloration signalée chez tous les Bacilles de ces cultures artificielles par la plupart des observateurs qui en ont obtenu.

Spronck signale de plus le fait intéressant de l'agglutination des Bacilles de ces cultures par le sérum sanguin de sujets lépreux; dans ces cas, le pouvoir agglutinant est compris entre 70 et 1000, rarement au-dessous, jamais au-dessous de 30. Chez les sujets non lépreux, l'agglutination s'observe également, mais à un taux d'ordinaire inférieur à 1 p. 20 et jamais au delà de 1 p. 30. Mais ce fait d'agglutination par le sérum de lépreux n'a pas une valeur suffisante pour permettre l'identification du Bacille en question avec le *Bacille de la lèpre.*

Teich (1) a obtenu des cultures semblables à celles de Spronck, et conclut à l'identité des espèces cultivées par les observateurs précédents en admettant que le polymorphisme est dû aux conditions de culture. Pour lui, toutes sont du véritable *Bacille de la lèpre.*

Deycke (2) a eu des cultures d'une forme de *Streptothrix* à filaments ramifiés en ensemençant dans de la solution physiologique maintenue à 37° des nodules lépreux prélevés d'une manière aseptique. Le réensemencement sur gélose, et surtout sur gélose additionnée de matière cérébrale, donne de petites colonies rayonnées ; et en bouillon des flocons sphériques. Ces éléments restent colorés par la méthode de Gram et se montrent relativement acido-résistants. Ce sont ces mêmes formes qui paraissent avoir été isolées et cultivées par Rost (3) et Williams (4).

Il paraît bien probable que les cultures obtenues par ces divers expérimentateurs sont plutôt des cultures de simples Bacilles acido-

(1) Teich, Beiträge zur Kultur der Leprabacillen (*Centralbl. für Bakt.*, XXV, 1899, p. 756).

(2) Deycke, Lepra in der Türkei (*Internat. Dermatologen Kongress*, I, sept. 1904).

(3) Rost, The Cultivation on the Bacillus of Leprosy and the Treatment of cases by means of a Vaccine prepared from the Cultivations (*Scientif. Memoirs by off. of the med. and sanit. depart. of the Govern. of India*, n° 42, part. I, 1911).

(4) Williams, The Cultivation of Leprosy Bacillus (*Ibid.*, part. II).

résistants qui se rencontrent si fréquemment dans l'organisme, vivant en simples saprophytes sur la peau, les muqueuses, etc., ou accompagnant les véritables agents d'infection dans diverses lésions.

Weil (1) et à sa suite Nicolle (2) paraissent avoir réussi à cultiver le *Bacille de la lèpre*, et en même temps avoir aussi démontré la très grande difficulté qu'il y a à le faire végéter sur des milieux artificiels. C'est ce caractère surtout qui peut permettre de mettre en doute les résultats positifs énoncés précédemment et de se rallier à l'idée qui vient d'être émise ci-dessus.

Weil part exclusivement de lèpre tuberculeuse et d'un léprome récent contenant d'ordinaire de nombreux Bacilles en pleine vitalité, se colorant fortement et entièrement. La surface est lavée à l'éther ; on abrase les couches superficielles avec un couteau stérilisé, et on enfonce dans la masse une pipette stérilisée à grosse effilure. On ramène un petit cylindre de matière assez molle, qu'on ensemence sur les milieux par portions bien écrasées sur la surface. Les seuls milieux qui lui ont réussi sont la gélose glycérinée additionnée de 1 de sérum pleurétique humain pour 3 de gélose, mais surtout la gélose glycérinée additionnée de 1 pour 4 de jaune d'œuf non cuit. La culture commence vers le cinquième jour ; c'est une petite colonie blanchâtre qui s'accroît lentement et devient blanc jaunâtre. Elle s'arrête vers le vingt-cinquième jour et ne donne jamais de nouvelle culture par réensemencement. Cette culture a une consistance ferme, se morcelle et s'émulsionne facilement.

De meilleurs résultats sont obtenus par la culture dans l'œuf vivant. On flambe le gros bout de l'œuf et on y fait un trou avec une vrille stérilisée. On introduit jusque dans le jaune la pipette qui a pris la semence et par plusieurs insufflations légères on en assure la pénétration dans le milieu. On retire la pipette, ferme le trou à la cire Golaz et place l'œuf à 37°. Weil a obtenu deux résultats positifs sur vingt-six ensemencements. A l'ouverture de l'œuf, on trouve dans le jaune un nodule d'un blanc jaunâtre, du volume d'un grain de chènevis, qui est formé par un amas de colonies du *Bacille de la lèpre*. Ces Bacilles des cultures restent colorés par la méthode de Gram, se colorent rapidement à froid par la fuchsine phéniquée et sont nettement acido-résistants.

Nicolle a seulement observé un léger début de culture dans des tubes de sang coagulé ou de gélose au jaune d'œuf, mais seulement dans l'eau de condensation et après ensemencement abondant.

Campana (3) dit avoir réussi des cultures dans l'œuf. Le Bacille qu'il a obtenu n'est pas acido-résistant et pas inoculable aux animaux.

Rost (4), dans trois cas de lèpre, aurait observé la culture de Bacilles acido-résistants dans un milieu où entrent du lait et de la macération de

(1) Weil, Essais de culture du Bacille lépreux (*Ann. de l'Inst. Pasteur*, XIX, 1905, p. 793).

(2) Nicolle, Recherches expérimentales sur la lèpre (*Ibid.*, XX, 1906, p. 389).

(3) Campana, Ueber die Kultur des Leprobacillus und die Uebertragung der Lepra auf Thiere (*Zeitschr. für Hygiene*, LXXVI, 1910, p. 361).

(4) Rost, The cultivation of bacillus of leprosy and the treatment of case by means of a vaccine prepared from the cultivations (*Sc. Mém. of the Govern. of India*, 1911, n° 42).

poisson. Ces Bacilles ne semblent pas être pathogènes pour les singes.

Williams (1) a eu des cultures d'un *Streptothrix* non acido-résistant, semblable à celui de Deycke.

Duval (2) dit que les cultures, sauf la première qui est difficile, se développeraient facilement sur les milieux solides contenant des acides aminés provenant soit de la digestion tryptique des matières protéiques, soit du développement d'autres microbes protéolytiques. Les colonies sont jaune-citron ou orangées.

INOCULATION EXPÉRIMENTALE

Arning (3) aurait obtenu un résultat positif en inoculant des produits lépreux à un condamné à mort, aux îles Sandwich, en 1884.

Melcher et Orthmann (4) ont déterminé, par inoculation intra-oculaire de produits lépreux au lapin, une généralisation rappelant la tuberculose miliaire. Damsch (5) et plusieurs autres (6) n'ont guère été plus heureux. Tedeschi (7) aurait observé la mort au bout de six jours, chez un singe, après inoculation intracranienne de produits lépreux; l'exsudat des méninges, la moelle épinière, la rate contiennent de nombreux *Bacilles de la lèpre*. Il se pourrait que divers expérimentateurs aient inoculé, sans s'en apercevoir, du *Bacille de la tuberculose*, la tuberculose venant souvent compliquer la lèpre à une période avancée de la maladie.

La plupart des cultures obtenues jusqu'ici n'ont montré aucun pouvoir pathogène.

Nicolle a démontré que certains singes inférieurs, en particulier le bonnet chinois (*Macacus sinensis*), offraient, vis-à-vis de l'inoculation des produits lépreux, une sensibilité manifeste. A la suite de l'inoculation sous-cutanée, après une longue incubation, il se produit chez eux une lésion locale bien caractérisée qui guérit après un certain temps. En répétant l'inoculation après guérison, on constate une réceptivité de plus en plus grande qui se traduit par une diminution de la période d'incubation et par une durée plus longue des lésions. Seule, l'inoculation par la peau fournit de tels résultats.

Avec le produit de ses cultures, Duval (8) aurait obtenu chez le *Macacus rhenus*, à la suite d'inoculation sous-cutanée, le développement de tumeurs en tout semblables aux lépromes humains.

(1) Williams, The cultivation of the leprobacillus (*Ibid.*).

(2) Duval, The cultivation of the leprosy bacillus from the human tissues with special reference to the amino-acids as culture media (*Journ. of exper. med.*, XIII, mars 1911).

(3) Arning, Leprabacillen in Nervenlepra (*Vers. d. Naturforsch. und Aertze*, 1886).

(4) Melcher et Orthmann, Uebertragung von Lepra auf Kaninchen (*Berlin. klin. Wochenschr.*, 1885).

(5) Damsch, Uebertragungsversuche von Lepra auf Thiere (*Virchow's Arch.*, XCII).

(6) Wolters, Der Bacillus leprae; zusammenfassender Bericht (*Centralbl. für Bakt.*, XIII, 1893, p. 469).

(7) Tedeschi, Ueber die Uebertragung der Lepra auf Thiere (*Centralbl. für Bakt.*, XIV, 1893, p. 113).

(8) Duval, The experimental production of leprosy in the Monkey (*Journ. of exper. med.*, XIII, mars 1911).

HABITAT ET RÔLE ÉTIOLOGIQUE

Le Bacille se trouve en grande quantité dans les lésions lépreuses, comme il a été dit ci-dessus. C'est le système lymphatique qui paraît être son habitat préféré. On le trouve d'ordinaire en grande abondance dans la rate et dans la moelle des os. Dans bien des cas, le système nerveux est particulièrement envahi.

Dans les organes d'individus lépreux, les Bacilles se trouvent dans les cellules ou hors des cellules (1). Dans le foie, ils se rencontrent en grand nombre dans les espaces lymphatiques et dans les vaisseaux lymphatiques du tissu conjonctif interlobulaire; dans la rate, ils se trouvent de préférence dans le réseau conjonctif. On constaterait assez fréquemment la présence de ces Bacilles dans le sang (2). D'après Gougerot (3), on ne le rencontre pas dans le sang au début, quand l'affection est localisée, et elle peut rester longtemps localisée; la bacillémie s'observe seulement au moment des poussées aiguës éruptives. Doutrelepont en a trouvé dans le sang du cœur à l'autopsie. Neisser n'a jamais pu en rencontrer dans plus de cent préparations de sang. La dissémination dans le corps se fait donc à la fois par les vaisseaux lymphatiques et par les vaisseaux sanguins.

Le caractère contagieux de la maladie est tout à fait hors de doute; elle se transmet d'homme à homme, mais lorsqu'il existe probablement des conditions de réceptivité encore très peu connues, parmi lesquelles la misère sociale, l'alimentation défectueuse, le défaut de soins doivent jouer un grand rôle (4). On tend à faire jouer aux Insectes piqueurs, poux, punaises, etc., un rôle actif dans la contamination.

On a recherché en vain le *Bacille de la lèpre* dans l'air, dans l'eau, dans différentes substances alimentaires de pays où la maladie est endémique, la Norvège et certaines contrées d'Orient.

Stephansky (5) et Dean (6) ont décrit un Bacille acido-résistant dans une maladie cutanée, une sorte de *pseudo-lèpre*, des rats d'égout. Ce Bacille se trouve aussi en très grande abondance dans les cellules du derme et forme dans cette couche des amas similaires à ceux que l'on observe dans la lèpre. Ils n'ont pas pu obtenir de cultures.

Olschanetzky (7) a isolé, dans les mêmes conditions, une forme de *Streptothrix* acido-résistante, se rapprochant du Bacille de Czaplewski, donnant facilement des cultures pathogènes pour le rat en injection intrapéritonéale.

Ces diverses formes ne paraissent avoir aucun rapport avec la lèpre humaine.

(1) Musehold, Lepra in Leber und Milz (*Arb. aus dem kaiserl. Gesundheitsamte*, XIV, 1898, p. 71).

(2) Stephan, Ueber den Nachweiss der Leprabacillen im Blute bei Lepra anaesthetica. Thèse de Strasbourg, 1896.

(3) Gougerot, Marche de l'infection lépreuse (*Tribune médicale*, 2 mars 1906).

(4) Zambaco, De la lèpre observée à Constantinople, 1885.

(5) Stephansky, Eine lepraähnliche Erkrankung der Haut und der Lymphdrüsen bei Wanderratten (*Centralbl. für Bakt.*, I Abth., Originale, XXXIII, 1903, p. 481).

(6) Dean, A disease of the rat caused by an acid-fast Bacillus (*Ibid.*, XXXIV, 1903, p. 222).

(7) Olschanetzky, Ueber ein neues alkohol-und saurefestes Stäbchen (*Ibid.*, XXXII, 1902, p. 16).

RECHERCHE ET DIAGNOSTIC

Il est souvent d'une très grande importance de faire le diagnostic tout au début, alors que les lésions peuvent être tout à fait locales ; il est possible d'agir avec plus d'effet.

Ici le diagnostic bactériologique est important pour établir la nature d'une affection si polymorphe à notre époque.

Pour les lésions cutanées, il faut faire une biopsie, prélever un fragment de peau, en faire des coupes, des frottis, les soumettre aux réactions de coloration ; on peut faire également des frottis sur lamelles avec les produits suspects. La lésion véritablement primitive est la *tache lépreuse*, rosée, plus ou moins foncée, souvent unique, anesthésique ; on trouve au-dessous une induration, indiquant une infiltration du derme : la biopsie est facile grâce à l'anesthésie. On peut prélever aussi une portion de muqueuse lésée, même un peu d'un tronc nerveux superficiel altéré.

Le mucus nasal renfermerait très tôt des Bacilles, fait dû aux lésions très fréquentes, certains disent même constantes, de la muqueuse pituitaire; des Bacilles se trouvent alors facilement dans des préparations de mucus nasal.

Leredde et Pautrier (1) trouvent que l'on arrive plus aisément à trouver les Bacilles dans le mucus en administrant une quantité d'iodure de potassium suffisante pour provoquer un écoulement nasal séreux.

Il faut se souvenir ici de la présence possible et fréquente du *Bacille pseudo-tuberculeux* signalé par Karlinski dans le mucus nasal (p. 791) et de la possibilité d'erreur de diagnostic de ce fait.

Le pus des lésions suppurées contient toujours le Bacille en abondance ; mais ici il y a d'ordinaire présence d'autres microbes d'infections secondaires, venant compliquer le processus, *Microbes pyogènes*, *Bacille pyocyanique*, *Bacille tuberculeux*, etc.

La recherche dans le sang se fait avec du sang pris dans une veine céphalique. Les Bacilles peuvent y être très nombreux, ou rares et même absents. On a vu qu'il faut toujours choisir un moment de poussée aiguë. On peut alors en trouver de très nombreux, disséminés entre les leucocytes, pouvant être agglomérés en paquets ou isolés ; ils ont une tendance à se disposer parallèlement ; presque tous sont libres dans le liquide, de très rares englobés par les polynucléaires.

La distinction avec le *Bacille de la tuberculose* se fera facilement en ce que le *Bacille de la lèpre* se colore vite, en quelques minutes, par les solutions ordinaires et par la méthode de Gram, tandis que le premier ne se colore pas ou seulement après un long séjour dans les bains en question. La grande abondance des Bacilles dans certains éléments ne se rencontre guère qu'avec le *Bacille de la lèpre*. L'inoculation au cobaye fera reconnaître la tuberculose. Dans les cas où les deux microbes seraient associés, l'examen microscopique et l'inoculation feront admettre leur présence simultanée.

Le *séro-diagnostic* peut, d'après Spronck, donner de bonnes indications dans les conditions citées plus haut, mais avec les réserves qui ont été faites.

(1) Leredde et Pautrier, *Soc. de Biol.*, 20 novembre 1902.

Diverses tentatives de *sérothérapie* et de *vaccination* ont été faites. Il ne semble pas qu'elles aient eu des résultats positifs.

BACILLUS MALLEI Loeffler.

(Bacille de la morve.)

Atlas de microbiologie, pl. xv.

La morve est une affection contagieuse à un haut degré qui sévit sur les chevaux, les ânes et les mulets. Elle y est incurable et le plus souvent mortelle. Elle est caractérisée par des lésions viscérales importantes, des nodules spéciaux qui se forment surtout dans la rate et dans les poumons, des abcès métastatiques dans divers organes, souvent les testicules ; ces nodules, qui sont de véritables tubercules, tendent vers la caséification ; lorsqu'ils peuvent s'ouvrir à l'extérieur, comme sur la peau et la pituitaire, ils donnent des ulcérations sans tendance à la cicatrisation. Ce n'est que plus tard qu'apparaissent l'induration des ganglions lymphatiques, la *glande*, et l'inflammation ulcéreuse, *chancre*, de la muqueuse pituitaire, cause du *jetage* visqueux et gluant L'affection peut avoir une marche lente, chronique, en présentant les mêmes symptômes. Lorsque les lésions apparentes sont localisées à la peau, on lui donne le nom de *farcin*.

La présence de Bactéries, dans le pus et le suc des glandes vasculaires sanguines, a été reconnue avec certitude par Christot et Kiener (1), qui ont décrit des *Micrococcus* et des bâtonnets mobiles de 2 à 10 μ de long. Mais l'origine bactérienne de la maladie n'a été véritablement démontrée que par les travaux de Bouchard, Capitan et Charrin (2) qui, en 1881, ont obtenu, du pus d'abcès d'un homme atteint de morve, des cultures dans du bouillon ayant déterminé chez les cobayes et chez un âne l'apparition des symptômes de la morve. L'année suivante, ces mêmes expérimentateurs arrivaient à des résultats aussi favorables en usant de pus et de jetage d'un cheval morveux. Des cinquième et sixième cultures ont fait périr deux ânes de la morve aiguë typique.

Loeffler et Schütz (3) énonçaient peu après des conclusions identiques et étaient parvenus à isoler d'une façon certaine la Bactérie pathogène, que Bouchard, Capitan et Charrin paraissent n'avoir pas eue, à ce moment-là, en cultures pures. Les caractères spécifiques ont dès lors été minutieusement établis dans les travaux de Kitt (4), Weichselbaum (5) et surtout dans un beau mémoire de Loeffler (6) où l'on trouvera tous les détails relatifs à la morve expérimentale.

(1) Christot et Kiener, *C. R. de l'Acad. des sc.*, LXVIII, 1878, p. 1054, et *Recueil de méd. vétér.*, 1868, p. 93.

(2) Bouchard, Capitan et Charrin, Sur la culture du microbe de la morve et sur la transmission de la maladie à l'aide des liquides de culture (*Bull. de l'Acad. de méd.*, 27 décembre 1882). Voy. surtout le rapport de Bouley, *Ibid.*, 1883, p. 1239.

(3) Loeffler et Schutz, Ueber den Rotspilz (*Deutsche med. Wochenschr.*, 1888, n° 52).

(4) Kitt, Versuche über den Züchtung der Rotzpilzer (*Jahresb. der München. Thierartz.*, 1883, 1884).

(5) Weichselbaum, Zur Aetiologie der Rotzkrankheit des Menschen (*Wiener med. Wochenschr*, 1885).

(6) Loeffler, Die Aetiologie der Rotzkrankheit (*Arb. aus dem kaiserl. Gesundheitsamte*, I, p. 41, 1886).

MORPHOLOGIE

Les *Bacilles de la morve* se rencontrent dans les sécrétions pathologiques des animaux atteints, pus et jetage surtout; ils sont très abondants dans les nodules qui s'observent à l'autopsie, surtout dans les poumons et dans la rate, ressemblant de prime abord à des granulations tuberculeuses, dans les ulcérations de la peau ou des muqueuses et dans le pus des abcès.

Pour Rudenko (1), ils montrent une véritable élection pour les ganglions lymphatiques. On les y trouve, dans tous les cas de morve, aiguë ou chronique, souvent vingt-quatre heures à peine après l'infection.

Caractères microscopiques. — Ce sont des bâtonnets mesurant de 2 μ à 5 μ de long et de 0,5 μ à 1 μ de large, de la grandeur des *Bacilles*



Fig. 276. — *Bacilles de la morve.* D'une culture sur pomme de terre glycérinée et légèrement caféinée, âgée de six jours. 1000/1.

tuberculeux, mais un peu plus épais (fig. 248); ils sont droits ou légèrement courbes.

Ces formes, que l'on peut appeler *formes moyennes*, sont toutefois sujettes à de grandes variations qui paraissent dépendre du milieu où végète le microbe, la nature et l'âge de la culture ou l'espèce animale inoculée.

Dans les cultures en bouillon ordinaires et dans les cultures sur pomme de terre âgées, les bâtonnets sont beaucoup plus courts, ressemblent même parfois presque à des Microcoques (fig. 276).

D'autres fois, on trouve de longs filaments, simples ou renflés en massue à une extrémité, parfois aux deux, des formes ovoïdes ou piriformes; dans certains cas, on observe même la production de véritables ramifications latérales, ce qui a fait rapprocher ces espèces des *Clado-*

(1) Rudenko, Bacteriolog. Untersuchung der Halslymphdrüsen von Rotzkranken Pferden. Charkow, 1889.

thrix ou *Streptothrix* (1). Dupuy (2) signale des formes streptococciques, streptobacillaires, et même des sortes de longs spirilles.

Les Bacilles semblent présenter de légers mouvements (Dupuy). Ils ne produisent pas de spores; les taches claires signalées comme telles ne paraissent pas du tout avoir cette signification.

Coloration. — Ils se colorent par les procédés habituels, mais inégalement et souvent d'une façon peu intense; les méthodes à préférer sont la coloration au bleu de Loeffler ou de Kühne, la fuchsine de Ziehl, la thionine phéniquée ou la coloration à l'eau anilinée additionnée de violet de gentiane à laquelle on ajoute une très faible quantité de solution de potasse ou d'ammoniaque. La méthode de Crouch pour le *Bacille de la diphtérie* colore souvent, mais plus lentement ici, des grains plus

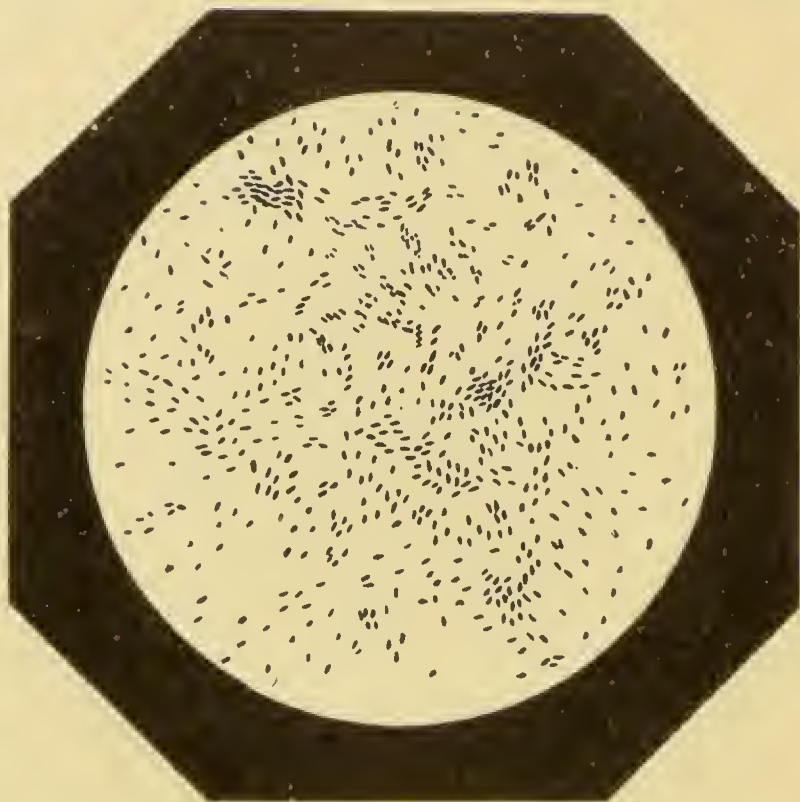


Fig. 277. — *Bacilles de la morve.* D'une culture sur pomme de terre ordinaire, âgée de vingt jours. 1000/1.

ou moins volumineux dans le contenu bacillaire. Ils se *décolorent* par la méthode de Gram et très régulièrement aussi par la méthode de Claudius.

D'après Kühne (3), on arrive aisément à les reconnaître dans les nodules spéciaux, en traitant les coupes de la façon suivante : Avant la coloration, les coupes sont privées d'alcool par un séjour dans l'eau. Puis on les porte pendant trois ou quatre minutes dans un bain de bleu de méthylène phéniqué (eau, 100; acide phénique, 5; alcool, 10; bleu de méthylène, 1,5). On décolore par un passage rapide dans l'eau aci-

(1) Marx, Zur Morphologie des Rotzbacillus (*Centralbl. für Bakt.*, XXV, 1899, p. 274). — Galli-Valerio, Contribution à l'étude de la morphologie du *Bacillus mallei* (*Centralbl. für Bakt.*, XXVI, 1899, p. 177, et XXVIII, 1900, p. 353). — Lubarsch, Zur Kenntniss der Strahlenpilze (*Zeitschr. für Hygiene*, XXXI, 1899, p. 213).

(2) Dupuy, A propos d'un cas de morve humaine. Thèse de Nancy, 1902.

(3) Kühne, Ueber Färbung der Bacillen in Malleusknoten (*Fortschr. der Med.*, 1888, p. 860).

dulée à l'acide chlorhydrique et on lave à fond à l'eau distillée. La préparation est déshydratée par une courte immersion dans l'alcool, puis dans l'huile d'aniline, et montée dans le baume. Les Bacilles sont bien colorés; les éléments des tissus ont une nuance très pâle.

Cultures. — Les cultures s'obtiennent facilement; elles ne se font pas d'ordinaire au-dessous de 20°, très peu au-dessous de 25°, sauf sur la gélose glycérinée de Nocard et Roux, qui est un milieu très favorable pour cette espèce. L'optimum de température est placé vers 37°; le développement s'arrête à 43°; les cultures meurent à 55°. Elles ne se font bien qu'en présence d'air; d'après Marx, cependant, le *Bacillus mallei* pousserait aussi en anaérobie, mais faiblement.

Bouillon. — Le développement est très rapide à 37°; le liquide est déjà trouble en vingt-quatre heures. La culture ne présente rien de spécial; elle reste toujours peu abondante et montre un dépôt blanchâtre, visqueux.

Gélatine. — Dans la gélatine maintenue fondue à 37°, il se forme une masse floconneuse, blanchâtre, visqueuse.

Gélose. — Sur *gélose glycérinée* à 37°, d'après Kranzfeld (1), le développement est très abondant. Le deuxième jour il s'est produit, le long de la strie, une bande large de 2 à 3 millimètres, d'un blanc mat, à bords souvent translucides, qui atteint 7 à 8 millimètres en six à huit jours. La végétation sur ce milieu se fait aussi à la température ordinaire, mais un peu plus lentement.

Sérum. — Sur sérum à 37°, on obtient des gouttelettes transparentes, un peu jaunâtres, ou une très mince couche jaunâtre, visqueuse.

Pomme de terre. — Les cultures sur pomme de terre sont tout à fait caractéristiques. Au deuxième jour, on aperçoit sur la surface de section une couche mince, légèrement jaunâtre, transparente; le lendemain la couche devient uniforme, plus foncée, d'aspect ambré. Au bout de six à huit jours, cette culture ambrée, transparente, devient opaque et prend une teinte brun rougeâtre. Une zone de substance environnante de la pomme de terre gagne une faible nuance verdâtre ou brunâtre. Cette forme de culture est très constante; et on l'obtient toujours, quels que soient la provenance et l'âge de la matière qui sert à l'inoculation. Elle peut être considérée comme caractéristique; la culture du *Bacille du pus bleu* a un aspect semblable, mais elle ressemble bien moins à l'ambre jaune et les cultures âgées de quelques jours ont un reflet nacré; enfin, dans les cas douteux, en traitant par de l'eau ammoniacale, on obtient la coloration bleue de la pyocyanine.

La forme décrite par Babès sous le nom d'*Ascobacterium luteum*, qui sera décrite plus loin, a été rencontrée dans mon laboratoire, dans du pus d'un jetage morveux, à côté du *Bacille de la morve*. La culture sur pomme de terre du premier microbe, jaune un peu ambré, peut en imposer pour celle de la morve et faire commettre une erreur de diagnostic. L'examen microscopique, montrant les courts bâtonnets réunis en grand nombre dans une même capsule, fera aisément reconnaître l'*Ascobacterium*.

(1) Kranzfeld. Zur Kenntniss der Rotzbacillus (*Centralbl. für Bakt.*, II, 1887, n° 10).

Sur *pomme de terre glycérinée*, la culture est plus rapide et beaucoup plus abondante : sa coloration est d'un jaune saumoné.

CAROTTE. — On n'y remarque pas de culture visible, mais en raclant la surface on enlève une mince couche muqueuse formée de bâtonnets plus fins que sur les milieux habituels.

SALSIFIS GLYCÉRINÉS. — Le Bacille y pousse très abondamment ; la culture gris jaunâtre, pultacée, recouvre tout le milieu en quelques jours. Les bâtonnets y sont aussi très fins.

LAIT. — Le lait est coagulé en dix à douze jours, mais il ne se produit pas de peptonisation de la caséine.

PROPRIÉTÉS BIOLOGIQUES

Vitalité et virulence. — Ces cultures, celles sur pomme de terre entre autres, sont virulentes tout comme les produits pathologiques recueillis sur les animaux malades ; aussi ne doit-on les manier qu'avec *une extrême prudence et de grandes précautions.*

La virulence s'exalte par passages successifs chez les animaux bien réceptifs.

L'inoculation aux animaux réceptifs, particulièrement au cobaye et à la souris de champ, détermine les symptômes de la morve expérimentale. Cependant les produits de cultures, pas plus du reste que le virus pris sur l'animal malade, ne conservent bien longtemps leur virulence et même la propriété végétative ; une culture vieille d'un mois peut ne plus donner de résultats à l'ensemencement. Le virus perd son activité par la dessiccation entre quelques jours et trois mois, suivant les conditions de l'expérience : Loeffler donne, à ce point de vue, quatre mois comme un terme absolu. La lumière exerce aussi une action destructive certaine.

Nicolle (1) conseille le moyen suivant de conserver pendant longtemps l'activité d'une culture : On mélange des Bacilles d'une culture sur gélose avec du sérum de cheval additionné de trois parties d'eau et stérilisé à l'autoclave, de manière à avoir une émulsion épaisse, qu'on garde à la glacière en ampoules scellées. Après un an, on peut encore obtenir des cultures aussi actives que la culture pure.

Les cultures périssent après quelques semaines ; leur virulence diminue vite et a souvent disparu après une dizaine de jours. Dupuy a pu toutefois constater que des cultures sur salsifis glycérinés étaient encore bien vivantes et très virulentes après dix mois. La virulence peut s'exalter par des inoculations en série.

Les cultures sont détruites par une température de 55° prolongée pendant cinq minutes ou de 61° pendant une minute. Ce fait plaide fort en faveur de l'absence de formation de spores.

Donc, en général, la résistance aux agents extérieurs peut être considérée comme faible.

Action des antiseptiques. — Des recherches précises sur l'action des antiseptiques ont été faites par Loeffler, Nocard (2), Cadéac et Malet.

(1) NICOLLE, Études sur la morve expérimentale du cobaye (*Ann. de l'Inst. Pasteur*, XX, 1906, p. 633).

(2) NOCARD et LECLAINCHE, Les maladies microbiennes des animaux, 3e édit., 1903, II, p. 349.

Quelques résultats sont intéressants à connaître. L'acide phénique à 3,5 p. 100 détruit la virulence en cinq minutes; à 1 p. 100, il la respecte même après une demi-heure de contact. Le permanganate de potasse à 1 p. 100, l'hypochlorite de chaux à 23 p. 100, le sublimé à 1 p. 5000 la détruisent en deux minutes; le crésyl, la créoline, le lysol à 3 p. 100 en quelques minutes. L'eau de chaux, le sulfate de cuivre à 1 p. 10, le sulfate de fer à 1 p. 5, l'acide sulfurique à 2 p. 100 la détruisent après une heure. L'acide sulfureux est un bon désinfectant également (50 grammes de soufre par mètre cube et laisser un contact de vingt-quatre heures). Par contre, le sulfate de zinc, recommandé par le règlement de police sanitaire pour la désinfection des locaux, est absolument inactif.

Produits formés dans les cultures. — La nature des produits solubles formés par cette espèce est encore très peu connue.

Certains auteurs signalent des traces d'*indol*; la plupart pas du tout.

Il semble qu'il y ait parmi ces produits des toxines auxquelles on peut rapporter certains des symptômes de l'infection morveuse, entre autres la fièvre, la leucocytose intense, l'œdème par action vaso-paralysante.

Les Bacilles morveux tués sont toxiques et provoquent chez le cobaye une maladie plus ou moins rapidement mortelle (1).

Le produit connu sous le nom de *malléine* renferme certaines de ces substances actives. Préparé d'abord par les vétérinaires russes Helman et Kalning, il a été étudié en France par Roux et Nocard et a pris, à la suite des recherches de ce dernier savant, une importance considérable pour le diagnostic de la morve. Le mode de préparation utilisé par les savants français est le suivant : On met en culture, dans du bouillon glycériné, un *Bacille morveux* très virulent. Après un mois de séjour à l'étuve. les cultures sont stérilisées à l'autoclave, par un chauffage de trente minutes à 100°, puis concentrées au bain-marie jusqu'au dixième du volume primitif et filtrées sur papier Chardin; le liquide brun rougeâtre, sirupeux, obtenu, est la *malléine brute*.

Cette malléine est employée soit pure, soit plutôt après dilution au dixième dans l'eau phéniquée à 5 p. 1000.

L'inoculation sous-cutanée de un demi-centimètre cube de malléine ne produit à peu près rien chez le cheval sain ou atteint de toute autre affection que la morve. Chez le cheval morveux, au contraire, quel que soit le peu d'étendue des lésions, il se produit des phénomènes de réaction très nets, même avec un quart de centimètre cube de malléine; il se forme, au point d'inoculation, un œdème inflammatoire volumineux, douloureux, d'où partent des cordons sinueux se rendant aux ganglions voisins; cette tumeur persiste pendant plusieurs jours et ne disparaît qu'après cinq ou six jours. En même temps, l'état général est profondément modifié, l'animal est dans un grand état de prostration ; la température centrale s'élève graduellement de 1°,5, 2 degrés, même 2°,5, 3 degrés au-dessus de la normale. Cette hyperthermie, déjà notable huit heures après l'injection, atteint d'ordinaire son maximum de la dixième à la douzième heure, rarement vers la quinzième ou la dix-huitième. La température ne descend que lentement et n'est revenue à la normale qu'après deux ou trois jours. Ces symptômes sont

(1) Cantacuzène, De la maladie toxique produite par l'injection intrastomacale de Bacilles morveux tués (*Ann. de l'Inst. Pasteur*, XXI, 1907, p. 194).

de la plus haute importance pour le diagnostic de la morve, comme nous le verrons plus loin.

Foth (1) prépare une *malléine sèche* en traitant la malléine brute par vingt à trente fois son poids d'alcool absolu; le précipité, desséché dans le vide, est une poudre blanche, soluble dans l'eau, que l'on emploie chez le cheval à la dose de 5 centigrammes.

INOCULATION EXPÉRIMENTALE

Un certain nombre d'espèces animales peuvent contracter la morve expérimentale à la suite d'inoculations sous-cutanées ou intrapéritonéales, ou même d'ingestion de produits virulents.

Les *équidés* sont particulièrement réceptifs, l'âne en première ligne, le mulet et le cheval ensuite; la morve de l'âne affecte ordinairement le type aigu, celle du mulet et du cheval le type subaigu ou chronique.

Le *mouton* et la *chèvre* sont infectés assez facilement.

Le *chien* offre surtout des accidents locaux, des ulcères morveux où le Bacille spécifique se rencontre vite et facilement. La mort ne survient guère que chez les jeunes chiens avec des généralisations viscérales; on arrive au même résultat chez l'adulte en inoculant des doses massives.

Le *chat* est très sensible; il présente une ulcération locale en quelques jours et meurt après deux à quatre semaines avec des généralisations viscérales.

Chez le *lapin*, l'infection s'obtient plus difficilement et se borne souvent à un processus local; les injections intraveineuses à fortes doses déterminent plus souvent la généralisation et la mort.

Chez le *cobaye*, la morve développée à la suite d'inoculation est facile à reconnaître; le fait est important, surtout à cause de l'appoint qu'on en peut tirer dans le diagnostic de la morve du cheval dans les cas incertains, à durée longue, qui sont souvent à craindre à cause de la facilité de la contagion à l'homme. On inocule du bouillon de culture, ou des produits ou du jetage dilués dans de l'eau bouillie; on passe sur un linge et l'on injecte de 1 à 3 centimètres cubes sous la peau de la cuisse. Le cobaye inoculé meurt d'ordinaire du vingt-cinquième au cinquantième jour en présentant des abcès dans les testicules et de nombreux nodules spéciaux dans la rate, quelquefois de très petits dans le foie; on trouve dans le pus des abcès et dans le contenu de ces nodules des Bacilles, faciles à reconnaître à leur forme et à l'aspect de leurs cultures. La muqueuse nasale est recouverte en partie ou en totalité d'une masse muqueuse blanchâtre, renfermant de nombreux Bacilles. Au point d'inoculation, on peut observer un œdème peu étendu ou une ulcération morveuse.

L'inoculation intrapéritonéale donne des résultats plus rapides et plus nets; Straus (2) la conseille comme moyen de diagnostic rapide. On injecte à plusieurs cobayes mâles, dans le péritoine, selon la technique ordinaire (p. 355), 1 ou 2 centimètres cubes de la dilution préparée comme ci-dessus. L'inoculation est suivie, dès le deuxième ou le troisième jour,

(1) Foth, Ueber die Gewinnung eines festen Malleins. Berlin, 1896.

(2) Straus, Sur un moyen de diagnostic rapide de la morve (*Arch. de méd. expér.*, 1886).

d'un gonflement douloureux des testicules; la peau du scrotum est rouge, tendue; souvent elle s'ouvre et donne issue à du pus morveux. L'animal meurt en huit à quinze jours. A l'autopsie, on trouve une inflammation de la tunique vaginale qui est recouverte de granulations jaunâtres et souvent d'un exsudat purulent, riche en Bacilles; c'est une véritable *orchite morveuse*, *vaginalite morveuse* d'origine métastatique. Avec des produits de cultures très virulents, la dose à injecter pour observer ces symptômes doit être réduite à quelques gouttes; l'inoculation de fortes doses détermine une mort rapide, en deux ou trois jours, par une véritable *septicémie* morveuse.

Nicolle (1) a montré qu'il existait une différence très grande entre les mâles et les femelles, les premiers étant beaucoup plus sensibles à l'inoculation intrapéritonéale du virus morveux; les mâles jeunes résistent mieux que les adultes. Les animaux qui ont résisté à une première infection paraissent avoir acquis un certain degré d'immunité; leur sérum est devenu agglutinant vis-à-vis du *Bacille de la morve*; il ne paraît pas posséder de propriété préventive ou curative.

La *souris des champs* est très sensible à la morve; elle succombe en deux à huit jours après l'inoculation, avec des lésions viscérales étendues; la rate en particulier est très hypertrophiée. La *souris blanche* est souvent réfractaire; d'après Léo (2), l'immunité peut être vaincue par injection de phloridzine qui rend l'animal diabétique.

Le *spermophile* est très sensible à la morve. Gamaléia (3) le donne comme très favorable à l'exaltation de la virulence par inoculation en série; le Bacille exalté tue en deux ou trois jours d'une véritable *septicémie morveuse*.

Les *bovidés* sont tout à fait réfractaires.

Le *porc* est au moins très résistant; il ne peut prendre la morve que quand il est très affaibli.

La *souris blanche*, les *rats blancs* sont très résistants; on ne peut les infecter qu'à l'aide de certains artifices, l'inoculation intracérébrale ou intramédullaire, par exemple (Tedeschi).

Les *oiseaux* ne paraissent pas pouvoir contracter la morve.

Chez la *grenouille* inoculée, maintenue à 30°, on trouve, au bout d'une huitaine de jours, le *Bacille de la morve* en grande quantité dans le sang et tous les organes.

Le passage en série, chez les animaux réceptifs, lapin, cobaye, spermophile surtout, exalte singulièrement l'activité d'un virus, si l'on a soin d'inoculer, aussitôt la mort, le sang du cœur d'un individu dans les veines d'un autre. Après un certain nombre de passages, on obtient un virus d'une force très grande qui, par inoculation, ne détermine plus les symptômes morveux ordinaires, mais tue rapidement l'animal avec les symptômes d'une véritable septicémie.

L'homme paraît très sensible à l'inoculation de cultures virulentes, comme le prouvent déjà de funestes accidents de laboratoire (4); aussi

(1) Nicolle, Études sur la morve expérimentale du cobaye (*Ann. de l'Inst. Pasteur*, XX, 1906, p. 625, 698 et 801; XXI, 1907, p. 281).

(2) Leo, Beitrag zur Immunitätslehre (*Zeitschr. für Hygiene*, VII, 1890, p. 503).

(3) Gamaléia, Sur l'exaltation de la virulence du Bacille morveux (*Ann. de l'Inst. Pasteur*, IV, 1890, p. 103).

(4) Trofincoff, Infection mortelle par la morve au laboratoire (An. in *Revue d'hygiène*, 1897, p. 84).

ne peut-on recommander trop souvent de ne manier les cultures morveuses et produits virulents qu'avec une extrême prudence et en prenant des soins qui paraîtront même excessifs.

IMMUNITÉ ET SÉROTHÉRAPIE

On n'a encore que très peu de données sur l'immunité conférée par des atteintes faibles de la maladie, ou par des procédés artificiels. Galtier (1) a cependant remarqué que le chien, qui ne présente que des accidents localisés au point d'inoculation, peut contracter jusqu'à cinq fois cette affection, mais en offrant des symptômes de moins en moins marqués. Straus (2) a obtenu chez le chien, par inoculation intraveineuse de très faibles doses de cultures virulentes, une morve bénigne qui assure à l'animal une véritable immunité à l'égard d'injections intraveineuses de doses massives de cultures très actives. D'après Nocard (3), la morve doit être considérée comme pouvant récidiver.

Chenot et Picq disent avoir obtenu une certaine immunité et même des effets curatifs chez le cobaye à la suite d'injections de sérum de bovidés à doses massives.

La malléine ne possède aucune propriété immunisante (Nocard).

L'immunité des bovidés à l'égard de la morve a donné l'idée d'utiliser leur sérum dans un but thérapeutique. La question est encore à l'étude.

HABITAT ET RÔLE ÉTIOLOGIQUE

La morve contractée *naturellement* n'a été presque exclusivement observée que chez les équidés.

Elle se développe chez l'homme par contagion directe venant d'habitude du cheval ; aussi s'observe-t-elle surtout chez les individus que leur profession rapproche des chevaux, ânes ou mulets. Elle se présente à l'état aigu, subaigu ou chronique, ces deux derniers analogues au farcin des équidés (4). C'est une maladie ordinairement mortelle.

On a observé de ces mêmes cas de contagion chez la chèvre, le mouton, en contact avec des équidés morveux ; chez le chien et d'autres carnassiers nourris avec des viandes morveuses.

Le pus des ulcérations, le jetage, le contenu des tubercules morveux contiennent le Bacille en abondance. Chez le cheval, le sang n'est virulent qu'exceptionnellement ; chez l'homme et surtout le chat, il le serait souvent. Le suc musculaire, la salive, la sueur, l'urine peuvent renfermer des Bacilles. Le lait, la bile, le sperme, les larmes, l'humeur aqueuse ne sont virulents que s'ils ont été souillés par contact direct. Le vaccin paraît inoffensif, à condition cependant que du sang n'y soit pas mélangé.

(1) Galtier, Inoculation de la morve au chien (*C. R. de l'Acad. des sc.*, XCII, 1888, p. 303).

(2) Straus, Essais de vaccination contre la morve (*Arch. de méd. expér.*, I, 1889, p. 489).

(3) Nocard, *Recueil de méd. vétér.*, 1899, p. 502.

(4) Rémy, Morve chronique de l'homme (*Arch. de méd. expér.*, 1897, p. 141). — Busche, Ueber chronischen Rotz der menschlichen Haut (*Arch. für Dermat.*, XXXVI).

La contagion provient de la pénétration dans l'organisme de produits morveux. L'ingestion d'eau, d'aliments ou de poussières, souillés par des produits virulents, doit être le principal mode de contage. L'air expiré par les animaux malades n'est pas virulent, d'après les expériences de Cadéac et Malet (1) ; il en est de même des émanations cadavériques de ceux qui ont succombé. L'inoculation sous-cutanée ou le contact de matière virulente avec une blessure sont les modes les plus certains de contagion. Les injections de virus dans la trachée ne donnent pas fatalement la maladie ; il y a ici une tolérance très grande, subordonnée aux altérations de la muqueuse respiratoire. Cadéac et Malet (2) ont constaté deux fois sur treize la transmissibilité de la morve de la mère au fœtus, à travers le placenta. Babès (3) a observé que les Bacilles de la morve pouvaient même pénétrer dans l'organisme à travers la peau intacte. La possibilité de la contagion par ingestion est également démontrée. Le jetage est le véhicule ordinaire du contage. Desséché et exposé à l'air, le virus perd rapidement sa puissance. Du jetage morveux conservé dans l'eau a gardé sa virulence pendant dix-huit jours. La virulence est détruite par une ébullition de deux minutes dans l'eau ou par un séjour de cinq minutes dans l'eau à 80°.

Les précautions les plus minutieuses sont nécessaires pour empêcher l'affection de s'étendre, lorsqu'elle s'est déclarée dans une écurie, ou de se communiquer aux personnes qui approchent les animaux malades. Les locaux et les objets qui ont pu être souillés par le sang ou le jetage doivent être désinfectés avec soin, à l'eau bouillante ou avec une solution de sublimé, qui détruit facilement la virulence morveuse à 1 p. 10000.

Il ne semble pas jusqu'ici que la viande d'animaux morveux ait été la cause d'accidents; il est vrai que le seul animal de boucherie pouvant contracter la morve est le cheval. Toutefois, vu la possibilité de contagion que présente surtout le maniement de la viande crue ou l'absorption de viande peu cuite, il faut éloigner à tout prix ces viandes de la consommation. Elles n'ont guère de caractères distinctifs; ce sont les lésions des viscères et de la muqueuse nasale qui guideront; le diagnostic bactériologique et l'inoculation expérimentale seront d'un très grand secours.

RECHERCHE ET DIAGNOSTIC

La recherche microscopique directe des Bacilles dans les produits morveux est souvent très chanceuse, à cause de leur rareté fréquente et de leur coloration assez difficile.

La *mise en culture* donne de meilleurs résultats. Le milieu de choix est la pomme de terre. La culture du *Bacille de la morve* y apparaît très vite; son aspect est très caractéristique (p. 815). Il n'est guère possible de la confondre avec les cultures d'autres espèces qui peuvent se rencontrer dans les mêmes produits. Le *Staphylocoque pyogène doré*, entre

(1) Cadéac et Malet, Rech. exp. sur la morve. Toulouse, 1886. — Étude exp. de la transmission de la morve par contagion médicale ou par infection (*Revue de méd.*, 1887, n° 5, p. 337).

(2) Id., Sur la transmissibilité de la morve de la mère au fœtus (*C. R. de l'Acad. des sc.*, t. CII, 1887, p. 133).

(3) Babès, *Bull. de l'Acad. de méd.*, 20 mai 1890.

autres, qui est fréquent dans le jetage ou les ulcères morveux, donne des colonies beaucoup plus petites, plus bombées, d'un jaune doré, opaques. L'examen microscopique lèvera les doutes. Il en est de même pour l'*Ascobacterium luteum*.

L'*inoculation au cobaye* (p. 818) est un moyen très précieux, qui peut donner des résultats en quelques jours. Il faut cependant se souvenir que l'inoculation du jetage en particulier peut déterminer la mort rapide du cobaye par affection septique due à d'autres microbes présents dans le produit employé.

Les lésions testiculaires, si importantes, peuvent en outre être provoquées par d'autres microbes. Nocard (1) a isolé dans certaines *lymphangites ulcéreuses* du cheval une Bactérie en bâtonnets courts, assez épais, parfois légèrement effilés aux extrémités, qui, inoculée dans le péritoine de cobayes mâles, provoque une orchite semblable à l'orchite morveuse; ce microbe *reste* nettement coloré par la méthode de Gram et donne sur pomme de terre une culture blanchâtre, sèche, pulvérulente. Kütscher (2) a rencontré dans le jetage de chevaux morveux un fin Bacille qui reste aussi coloré par la méthode de Gram et donne sur pomme de terre de petites colonies sèches, d'un blanc pur: il croît facilement sur la gélatine qu'il liquéfie; l'inoculation au cobaye mâle donne aussi des lésions testiculaires semblables aux précédentes. Il est donc important de ne pas se borner, pour établir un diagnostic de morve, à rechercher les phénomènes testiculaires produits chez le cobaye, mais à employer simultanément les autres méthodes, les réactions colorantes, les aspects des cultures et l'emploi de la malléine.

Galtier a proposé l'*inoculation au chien*, en scarifications. La suppuration, l'œdème et l'apparence ulcéreuse des sillons permettent d'établir un diagnostic en quarante-huit heures. Toutefois, les résultats ne seraient pas constants.

On a aussi préconisé l'*inoculation à l'âne*, qui prend facilement et très vite la morve aiguë typique.

L'*emploi de la malléine* (p. 817) donne presque toujours des résultats très précis. Il est nécessaire, toutefois, de se mettre dans des conditions déterminées. Les animaux doivent être laissés en repos quarante-huit heures avant l'opération; pendant ce temps, on doit prendre plusieurs températures et éliminer les fébricitants. Ceux qui ne présentent qu'une réaction générale minime et une augmentation de température inférieure à 1°,5 devront être soumis à une nouvelle épreuve après un mois.

Le *séro-diagnostic* peut rendre des services, comme l'ont montré Bourges et Méry (3). L'agglutination des Bacilles des cultures fraîches est très nette à une dilution de 1 p. 1 000. Le sérum de chevaux sains ou atteints d'autres affections que la morve agglutine réellement, mais jamais au-dessus de 1 p. 300. En employant 1 de sérum pour 500 de culture, on peut espérer pouvoir établir si l'animal est morveux ou non. Toutefois, le pouvoir agglutinant ne se montrait bien développé, dans les expériences sur les cobayes, que neuf jours après l'inoculation,

(1) Nocard, Sur une lymphangite ulcéreuse simulant le farcin morveux chez le cheval (*Ann. de l'Inst. Pasteur*, X, 1896, p. 609).

(2) Kutscher, Zur Rotzdiagnose (*Zeitschr. für Hygiene*, XXI, 1895, p. 156).

(3) Bourges et Méry, Sur le séro-diagnostic de la morve (*Soc. de Biol.*, 5 févr. 1898, et *Arch. de méd. expér.*, XII, 1900).

intrapéritonéale. Le sérum normal de l'homme est nettement agglutinant pour le Bacille morveux; celui de l'homme morveux l'est toutefois plus fortement.

L'*ophtalmo-réaction* (1), la *cuti-réaction* (2), appliquées comme pour la tuberculose, en se servant de malléine, peuvent aussi donner de bonnes indications.

BACILLUS DIPHTERIÆ Loeffler.

(*Bacille de la diphtérie, Bacille diphtérique, Bacille de Klebs. Bacille de Loeffler.*)

Atlas de microbiologie, pl. VI et VII.

L'étude microscopique des fausses membranes diphtériques y a fait reconnaître la présence de Bactéries d'espèces diverses, qui n'ont évidemment pas la même importance dans le processus pathologique. A côté de l'espèce véritablement pathogène, cause de l'infection diphtérique proprement dite si contagieuse et souvent si grave, s'en trouvent d'autres qui peuvent jouer un rôle variable dans les phénomènes observés. Ces dernières peuvent être de ces Bactéries commensales, abondantes à la surface de certaines muqueuses, qui jouent souvent un rôle secondaire, contribuent peut-être à la formation des fausses membranes et aident ainsi à la végétation du parasite; ou bien elles sont des espèces réellement actives et pathogènes, contribuant parfois largement aux diverses manifestations pathologiques produites, se trouvant en *association* avec le *Bacille de la diphtérie*, ou même les occasionnant entièrement à elles seules. Le processus clinique de diphtérie n'est pas en effet sous la dépendance exclusive du Bacille spécifique de la diphtérie, mais peut être déterminé par une série de microbes distincts. C'est en particulier le cas de ces coccus très fréquents, dont Cohn avait fait l'espèce *Micrococcus diphtericus*, que Loeffler d'abord, nombre d'autres après lui, ont isolés des fausses membranes, qu'on peut même rencontrer seuls dans certaines fausses membranes, mais qu'il est nécessaire de bien distinguer du véritable *Bacille de la diphtérie*; c'est aussi le cas d'espèces diverses de Bactéries en bâtonnets dont l'énumération et les caractères distinctifs seront exposés plus loin.

Klebs (3) le premier, en 1883, a signalé la présence, dans les fausses membranes diphtériques, de bâtonnets qu'il donne déjà comme spécifiques. Loeffler (4) est parvenu à isoler et à cultiver ce microbe qu'il rencontra fréquemment dans les fausses membranes du pharynx et de la trachée et dans le suc pulmonaire d'un cas de bronchopneumonie diphtérique. Darier (5) est arrivé à des résultats analogues. Les recherches les plus

(1) Vallée, Sur un nouveau procédé de diagnostic expérimental de la tuberculose et de la morve (*Bull. de la Soc. centr. de méd. vétér.*, 1907).

(2) Martel, Application de la méthode de von Pirquet au diagnostic de la morve chez l'homme et chez le cheval (*Bull. de la Soc. centr. de méd. vétér.*, 1907).

(3) Klebs, Congrès de Wiesbaden, 1883 (*Arch. für exper. Path.*, I et IX).

(4) Loeffler, Untersuchungen über die Bedeutung der Mikroorganismen für die Entstehung der Diphterie beim Menschen, bei der Taube und beim Kalbe (*Mitth. aus dem kaiserl. Gesundheitsamte*, II, 1884, p. 421).

(5) Darier, Bronchopneumonie dans la diphtérie. Thèse de Paris, 1885.

complètes sur ce sujet sont sans contredit celles de Roux et Yersin (1), qui ont retrouvé le Bacille signalé par Klebs et Loeffler dans tous les cas de diphtérie vraie qu'ils ont examinés ; qui ont reproduit la diphtérie typique chez les animaux inoculés avec ces cultures, diphtérie avec fausses membranes, suivie de paralysies secondaires analogues à celles observées chez l'homme à la suite de la diphtérie ; qui ont reconnu dans ces cultures la présence d'une substance toxique soluble, tuant rapidement les animaux ou leur donnant des paralysies, suivant la dose injectée, sans aucune intervention de microbes vivants. Les recherches de Behring sur l'obtention de l'immunité, la communication de Roux au Congrès de Budapest en 1894, firent avancer d'un grand pas la question du traitement et de la prophylaxie de l'affection.

MORPHOLOGIE

Caractères microscopiques. — Dans les cas de diphtérie à marche rapide, après coloration au bleu de méthylène des coupes d'une fausse membrane diphtérique et de la muqueuse à laquelle elle est adhérente, on s'aperçoit que les parties superficielles de la fausse membrane sont formées par une couche de petits Bacilles presque à l'état de pureté, ou mélangés à d'autres bâtonnets, des coccus isolés ou des chaînettes. Ce sont les premiers de ces microbes qui doivent être regardés comme spécifiques.

Les caractères d'aspect et de forme du *Bacille de la diphtérie* sont sujets à des variations assez grandes suivant leur origine ; il est bon d'en être prévenu. Ce sont, en général, des bâtonnets droits ou courbés, *toujours immobiles*. Les extrémités sont arrondies, souvent plus ou moins renflées, ce qui donne à l'élément la forme d'une massue, l'aspect piriforme ou l'aspect en *os de grenouille*, en haltères (fig. 280). Lehmann et Neuman ont proposé la création d'un genre spécial, le genre *Corynebacterium*, pour les Bacilles présentant de tels renflements en massue ; ils font de cette espèce le *Corynebacterium diphteriæ*.

Fréquemment, ils sont presque aussi longs que le *Bacille de la tuberculose* et d'une épaisseur double, mesurant 2,5 μ à 3 μ de long sur 0,7 μ de large ; ils peuvent n'atteindre que 1 μ de longueur ou, au contraire, dépasser même 5 μ (fig. 278 et 279).

Parmi ces variations de dimensions, il est possible de distinguer une forme longue, atteignant 4 à 5 μ ou même plus, à bâtonnets assez minces, et une forme courte, de 0,6 à 0,8 μ de long, sur une largeur presque égale, à éléments parfois presque cocciformes. La forme longue paraît se trouver, souvent au moins, dans les formes graves. Ce n'est toutefois pas un caractère absolu.

Babès (2), puis Fraenkel (3) et surtout Bernheim et Folger (4) ont décrit

(1) Roux et Yersin, Contribution à l'étude de la diphtérie (*Ann. de l'Inst. Pasteur*, II, 1888, p. 628 ; III, 1889, p. 273, et IV, 1890, p. 384).

(2) Babès, Beobachtungen über die metachromatischen Körperschen, Sporenbildung, Verzweigung, Kolben und Kapselbildung pathogener Bakterien (*Zeitschr. für Hygiene*, XX, 1895, p. 412).

(3) Fraenkel, Eine morphologische Eigenthümlichkeit des Diphteriebacillus (*Hygienische Rundschau*, 1895, n° 8, p. 349).

(4) Bernheim et Folger, Ueber verzweigte Diphteriebacillen (*Centralbl. für Bakt.*, XX, 1896, p. 1).

des formes ramifiées dans les cultures. Ces formes s'observent souvent dans les cultures sur sérum de Loeffler et dans l'œuf cru, plus rarement



Fig. 278. — *Bacille de la diphtérie* dans les cultures : forme moyenne. 1000/1.

sur gélose glycérinée et dans le bouillon (fig. 280). Par ces formes en massues, cette production de ramifications, le *Bacille de la diphtérie* se



Fig. 279. — *Bacille de la diphtérie* dans les cultures : forme petite. 1000/1.

rapproche du *Bacille de la tuberculose* et du *Bacille de la morve* où de pareils faits ont été signalés ; c'est aussi ce qui conduit certains observateurs à le ranger, comme les précédents, parmi les *Streptothrix* ou *Cladothrix* (1).

(1) Meyerhoff, Zur Morphologie des Diphteriebacillus (*Arch. für Hygiene*, XXXIII, 1898, p. 1). — Spirig, Studien über den Diphteriebacillus (*Zeitschr. für Hygiene*, 1903, XLII, p. 420).

Les raisons de ces variations de forme ne sont pas encore bien connues; la constitution du milieu peut jouer un rôle, ou bien la présence de certaines substances, comme l'a vu Maassen en ajoutant au milieu 2,2 p. 100 de chlorure de lithium (1).

L'arrangement des bâtonnets peut aussi donner de bonnes indications. Souvent deux éléments sont unis à angle plus ou moins aigu, formant une sorte de V plus ou moins ouvert, de L ou d'accent circonflexe; ou bien réunis bout à bout par deux, ce qui est plutôt rare; les bâtonnets peuvent aussi se placer côte à côte, presque parallèlement, donnant l'aspect dit *en palissade*, ou bien se disposer très irrégulière-



Fig. 280. — Formes anormales du *Bacille de la diphtérie*. Cultures sur sérum et dans l'œuf. 1200/1.

ment les uns à côté des autres, en petits amas peu serrés, aspect dit *en broussailles*, *en paquets d'épingles*. Ces différents arrangements proviennent très probablement, en partie au moins, des particularités de développement. Les éléments jeunes paraissent pouvoir être produits par de petites masses protoplasmiques formées en un point du bâtonnet mère, souvent à l'une des extrémités. C'est une sorte de germination qui se fait directement, sur place. L'élément nouveau pousse obliquement ou perpendiculairement à l'élément mère et peut rester en cette situation, formant un V plus ou moins ouvert, ou un L, ou se sépare et s'accole souvent latéralement à celui qui lui a donné naissance.

Le contenu de l'élément présente souvent des vacuoles, surtout visibles sur les bâtonnets colorés, par l'absence de coloration à différents endroits.

On observe fréquemment aussi, dans les fausses membranes et dans

(1) Maassen, Die teratologische Wuchsformen (Involutions-formen) der Bakterien und ihre Bedeutung als diagnostisches Hilfsmittel (*Arb. aus dem kaiserl. Gesundheitsamte*, XXI, 1904, p. 385).

les cultures, des éléments fortement renflés, sphériques, ovoïdes, ou piriformes, que l'on doit considérer comme des formes de dégénérescence.

D'après Babès (1), dans certaines conditions, tout particulièrement en cultivant l'espèce dans de la gélatine à 22°, on observerait, mais rarement, la formation de spores allongées ou ovoïdes, de 1 μ de longueur environ, tantôt à une extrémité, tantôt au milieu ; ces spores se coloreraient par la méthode de double coloration indiquée page 393 et résisteraient à une température de 100°. Cette observation n'a pas été confirmée.

On peut toutefois, avec quelque raison, considérer ces amas plus ou

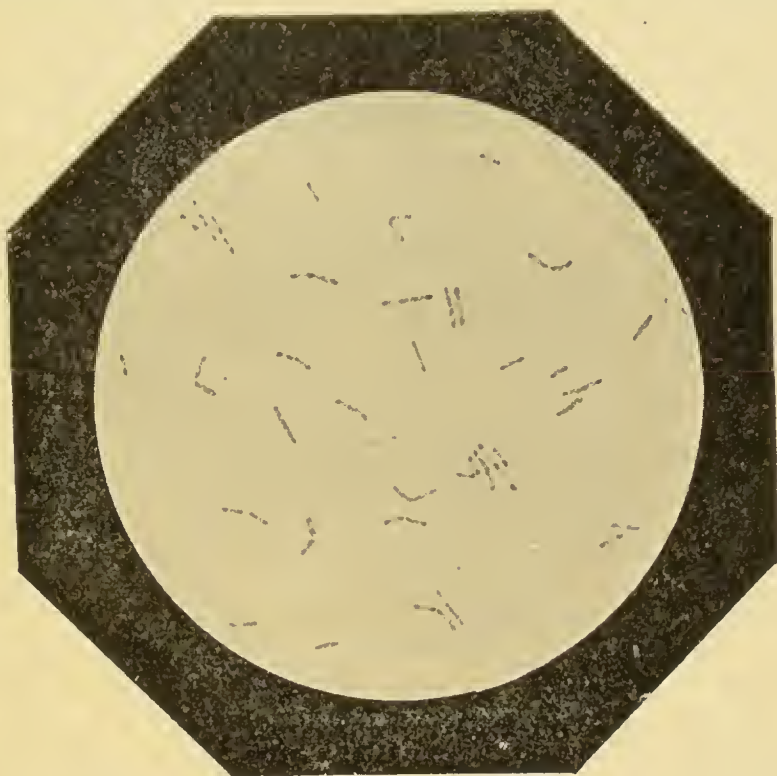


Fig. 281. — *Bacilles de la diphtérie*. Cultures sur sérum, de quatorze heures. Coloration de Crouch. 1200/1.

moins sphériques de protoplasma condensé comme un stade simple de formation de spore. Ce sont des masses protoplasmiques réfringentes, formées de matériaux denses, de réserve, pouvant, par une véritable germination, donner des éléments nouveaux. Ce sont là certainement les caractères fondamentaux de la spore. Il ne manque que la constitution de la membrane propre, que l'on peut concevoir biologiquement comme un caractère secondaire et qui paraît être la raison principale, sinon l'unique, de la résistance présentée par les spores à l'égard des agents de destruction, par conséquent simple organe de protection.

Coloration. — Le *Bacille de la diphtérie* se colore assez mal à l'aide des solutions aqueuses simples, bien mieux à l'aide du bleu de Loeffler, de la solution de Ziehl, du violet de Nicolle et surtout du bleu de Roux (p. 378).

Il ne *se décolore pas* par la méthode de Gram, mais ne garde alors souvent qu'imparfaitement le colorant, et encore ne doit-on pas faire

(1) Babès, Beobachtungen über die metachromatischen Körperchen, Sporenbildung Verzweigung, Kolben und Kapselbildung pathogener Bakterien (*Zeitschr. für Hygiene*, XX, 1895, p. 412).

agir l'alcool trop longtemps ; la préparation doit garder une teinte gris bleu.

La coloration ne se fait souvent que par places dans le corps du bâtonnet, laissant ainsi un ou plusieurs espaces clairs, représentant les vacuoles dont il a été parlé plus haut ; les formes à vacuole se trouvent surtout dans les vieilles cultures, la coloration des éléments jeunes se fait mieux et plus uniformément.

Les réactions spéciales (p. 29) font reconnaître dans les bâtonnets la présence de grains de volutine ; pour Hugo Marx (1), ils seraient en rapport avec la virulence et leur présence pourrait faire distinguer un *Bacille diphtérique* virulent d'un *Bacille pseudo-diphtérique*.

En usant de certains colorants, le bleu de méthylène en particulier, on constate qu'il existe, dans le corps protoplasmique, des granulations ou des grains plus gros, sphériques ou ovoïdes, se comportant autrement que le reste du contenu. Ces corps apparaissent au microscope colorés d'une nuance bien différente, d'un rouge-rubis brillant avec certaines positions de l'objectif. Babès (2) les a signalés en 1885 sous le nom de *corpuscules métachromatiques* (Voy. p. 28). Leur présence fréquente aux extrémités des bâtonnets leur fait donner aussi le nom de *corpuscules polaires*.

Leur présence est assez régulière chez le *Bacille de la diphtérie* pour qu'on ait cherché à en faire un caractère différentiel. On a imaginé, pour mieux les mettre en vue, des méthodes de coloration spéciales dont les préférables sont celles de Crouch (3) et de Neisser (4).

Méthode de Crouch. — La solution colorante employée est la suivante :

Solution de Crouch.

Solution de vert de méthyle à 1 p. 100	5 parties.
Solution de violet de dahlia à 1 p. 100	1 partie.
Eau	4 parties.

Laisser la coloration se faire pendant une seconde pour les Bacilles des cultures, pendant deux secondes pour les Bacilles des fausses membranes. On peut faire une double coloration avec la vésuvine ou le bleu de méthylène pendant deux à trois secondes. Laver à l'eau ordinaire.

Les bâtonnets ainsi colorés (fig. 281) montrent à chaque extrémité un petit grain rouge-rubis surtout bien net à la lumière de la lampe ; il est des bâtonnets qui en montrent jusqu'à quatre de grosseur semblable ou différente ; beaucoup de ces grains du milieu des bâtonnets paraissent nettement divisés à un très fort grossissement.

Ces grains se rencontrent dans les bâtonnets des cultures faites à toutes températures jusqu'à 37°.

(1) Hugo Marx et Waithe, Ein Verfahren zur Virulenzbestimmung der Bakterien (*Arch. für klin. Chir.*, XLII, 1900, p. 580).

(2) Cornil et Babès, Les Bactéries, 3e édition, t. II, p. 58.

(3) Crouch, The detection of the diphteria bacillus by its peculiar reaction toward certain stains (*New York med. Journ.*, LXII, 1895, n° 14).

(4) Neisser, Zur Differenzialdiagnose der Diphteriebacillus (*Zeitschr. für Hygiene*, XXIV, 1897, p. 443).

Méthode de Neisser. — Neisser emploie les deux solutions suivantes :

Solution I (NEISSER).

Un gramme de bleu de méthylène (GRUBLER) est dissous dans 20 centimètres cubes d'alcool à 96° ; on y ajoute 950 centimètres cubes d'eau distillée et 50 centimètres cubes d'acide acétique glacial.

Solution II (NEISSER).

Deux grammes de vésuvine sont dissous dans un litre d'eau distillée bouillante.

Il est nécessaire de filtrer, surtout pour la solution II.

Les lamelles préparées sont colorées à la solution I pendant une à trois secondes. Il faut laver à l'eau, uniquement à l'eau distillée à cause de l'influence mauvaise des sels de chaux et de magnésie (Kurth) (1) ; puis colorer de trois à cinq secondes dans la solution II ; laver encore à l'eau distillée.

Les grains, disposés comme précédemment, apparaissent plutôt d'un bleu noir. Les corps bacillaires sont colorés en brun.

Falières (2) a indiqué une modification de la coloration de Neisser qui donne de très bons résultats. On colore avec la solution :

Bleu de méthyle	1 gramme.
Borate de soude	$0^{gr},5$
Eau distillée	100 grammes.
Alcool absolu	VIII gouttes.

On lave à l'eau et on passe pendant une demi-seconde dans une solution aqueuse de vésuvine à 1 p. 1000.

Ces deux méthodes paraissent avoir une certaine valeur pour le diagnostic différentiel, sans toutefois qu'on puisse la regarder comme absolue. Il en sera parlé plus loin à propos du diagnostic.

Cultures. — Cette Bactérie ne se développe bien qu'à une température supérieure à 20°, très peu à 18° et cesse de croître à 42°. Son optimum de température semble être vers 35°. Elle végète surtout bien en présence de l'oxygène, mais peut aussi montrer un développement restreint en anaérobie.

Les milieux habituels conviennent d'ordinaire ; les milieux glycérinés, sérum et gélose surtout, donnent cependant une végétation plus abondante. Une réaction faiblement alcaline semble à préférer.

CULTURES DANS LE BOUILLON. — Le milieu se trouble très rapidement de douze à vingt-quatre heures à 37°, et d'une façon uniforme ; de petits grumeaux se déposent contre les parois du vase ; il se forme à la surface un léger voile, très fragile, surtout développé vers 30°-33° à un repos absolu, et au fond une couche blanchâtre, de plus en plus épaisse, un peu visqueuse, adhérente au verre. Le liquide s'éclaircit un peu à la longue, mais jamais d'une façon complète. Le bouillon, légèrement alcalin au début, devient d'ordinaire acide au bout de quelques jours ;

(1) KURTH, Ueber die Diagnose der Diphteriebacillus unter Berücksichtigung abweichender Culturformen desselben (*Zeitschr. für Hygiene*, XXVIII, 1898, p. 409).

(2) FALIÈRES, Des granulations polaires du Bacille diphtérique. Thèse de Bordeaux, 1902.

l'acidité persiste assez longtemps, puis elle est remplacée par une réaction alcaline si l'air a libre accès dans la culture. Les bouillons glycérinés ou sucrés deviennent plus rapidement acides que les bouillons ordinaires ; cette trop grande acidité nuit au microbe, qui y perd plus vite sa vitalité.

Avec certaines variétés, le trouble est très léger et très passager ; il se forme un voile plus ou moins épais, friable, surmontant un liquide clair. C'est le cas de la variété désignée sous le nom de *Bacille américain* (p. 839).

Dans le vide, le trouble du bouillon est moins prononcé, la culture est moins abondante qu'à l'air ; le liquide conserve indéfiniment la réaction acide.

Cultures sur gélatine. — Les cultures sur gélatine restent toujours très minimes à cause de la température basse, 23°-24°, au maximum avec 15 à 20 p. 200 de gélatine, qu'il est possible d'employer pour que la gelée ne fonde pas. La gélatine *n'est pas liquéfiée.*

Sur *plaques*, le microbe donne de petites colonies blanchâtres, punctiformes, qui ne grandissent guère.

En *piqûre*, le développement est très peu abondant de 20° à 22° ; on n'observe que de très petites colonies, clairsemées, dans le canal de la piqûre ; à 24°, le développement est un peu plus abondant et donne une mince culture en clou. Ces cultures sur gélatine renferment très souvent des formes anormales ; c'est dans de telles cultures maintenues longtemps à 18°-22° que Babès aurait observé la production de spores.

Cultures sur gélose. — Le développement s'y fait bien. Au bout de trente à quarante-huit heures à 37°, on distingue déjà les colonies comme de petites taches blanches, plus épaisses au centre ; elles peuvent confluer en une traînée d'un blanc grisâtre après quelques jours.

La *gélose glycérinée* semble mieux convenir (1). L'addition de glycérine paraît du reste favorable pour tous les milieux ; d'après Gossage (2), elle favoriserait la production des grains métachromatiques.

Cultures sur sérum. — C'est certainement le milieu qui convient le mieux à cette espèce ; elle y pousse très rapidement ; aussi est-il à recommander de s'en servir pour l'isoler des autres qui l'accompagnent souvent et y croissent moins vite qu'elle.

Les sérosités d'ascite et de pleurésie donnent de moins bons résultats que le sérum.

Loeffler recommande le *sérum peptonisé* obtenu en mélangeant trois parties de sérum de sang de veau ou de mouton et une partie de macération de viande de veau (*Fleisch-infus-pepton*, p. 231), peptonisée et sucrée à 1 p. 100, salée à 0,5 p. 100 et coagulant à 70°. Le développement du Bacille de la diphtérie y est un peu plus abondant que sur sérum ordinaire ; mais celui des autres espèces qui peuvent se trouver avec lui dans les fausses membranes de la diphtérie, par exemple, est de beaucoup exalté ; il devient alors plus difficile de faire la séparation.

Sur *simple sérum coagulé*, préconisé par Roux à cet effet, les colonies

(1) Michel, Das Wachstum der Diphteriebacillen auf verschiedenen Sera und Glycerinagar (*Centralbl. für Bakt.*, XXII, 1897, p. 259).

(2) Gossage, The influence of Glycerine in culture media on the diphteria bacillus (*The Lancet*, 15 août 1896, et 1898, n° 3807).

du *Bacille de la diphtérie* se développent moins vite et moins abondamment que sur sérum peptonisé; mais, par contre, les autres espèces végètent beaucoup moins vite, leurs colonies apparaissent bien moins tôt et grandissent moins vite; il est alors beaucoup plus facile de faire la distinction et l'isolement.

Roux et Yersin recommandent le procédé suivant pour isoler le *Bacille de la diphtérie* des fausses membranes qui en renferment : Un fil de platine est frotté légèrement sur la fausse membrane ou les produits suspects. A l'aide de ce fil, on ensemence, en une ou deux stries, successivement plusieurs tubes de sérum simple coagulé, *sans recharger le fil*, et l'on porte à l'étuve à 37°. Au bout de quinze à dix-huit heures, les colonies du *Bacille de la diphtérie* sont déjà bien développées. Ce sont de petites taches arrondies, de la grosseur d'une tête d'épingle, d'un blanc grisâtre, à centre plus opaque que la périphérie. A un faible grossissement, les bords sont légèrement onduleux, plus transparents; toute la colonie est finement granuleuse. Ces colonies grandissent avec l'âge et atteignent, après quatre à huit jours, un diamètre de 3 à 5 millimètres en conservant le même aspect.

Cobbett (1) emploie le *sérum alcalinisé* de bœuf ou, mieux, de cheval. Le premier est additionné de 2 grammes de glucose et de $1^{cc},75$ de solution de soude à 10 p. 100 pour 100 centimètres cubes de sérum et stérilisé à l'autoclave à haute température; le second de 2 grammes de glucose et seulement de $1^{cc},25$ à $1^{cc},30$ de solution de soude et stérilisé deux fois à un jour d'intervalle à 90°. Ces milieux sont très transparents.

Le mélange de gélose et de sérum donne un excellent milieu de culture; Joos (2) le recommande tout spécialement, le *Bacille de Loeffler* y poussant rapidement et d'autres espèces, souvent mélangées avec lui, beaucoup moins vite.

Nous reviendrons plus loin sur tous ces caractères à propos du diagnostic de la diphtérie.

Cultures sur pommes de terre. — Il ne se forme pas, sur la pomme de terre à réaction alcaline, de culture bien apparente; mais, si l'on racle au bout de quelques jours la surface ensemencée, on trouve de nombreux Bacilles dans le produit recueilli. Il ne se produit rien sur pomme de terre acide.

Cultures dans le lait. — Le lait est un bon milieu de culture pour le *Bacille diphtérique*; il n'y produit pas de coagulation, même après un long temps. Le lait de vache cru est particulièrement favorable, comme le montrent les recherches de Schottelius (3); ce liquide donne la réaction amphotère.

Cultures sur blanc d'œuf cuit. — Le microbe donne, en vingt-quatre heures, à 35°-37°, de petites colonies rondes, mates, peu transparentes, d'une blancheur moins éclatante que celle du substratum. En vieillissant, elles prennent une teinte jaune un peu rougeâtre. C'est une

(1) Cobbett, Alcalinisirtes Rinder und Pferdeserum als Hilfsmittel bei der Diphteriediagnose (*Centralbl. für Bakt.*, XXIII, 1898, p. 395).

(2) Joos, Untersuchungen über Diphteriediagnose (*Centralbl. für Bakt.*, XXV, 1899, p. 296 et 351).

(3) Schottelius, Ueber das Wachstum der Diphteriebacillen in Milch (*Centralbl. für Bakt.*, XX, 1896, p. 897).

méthode qui peut servir pour le diagnostic, lorsqu'on n'a pas de sérum à sa disposition (1).

CULTURE EN MILIEUX CHIMIQUEMENT DÉFINIS. — Dans le liquide d'Outchinski (2) (p. 227), le développement est peu sensible dans les premiers jours, puis, une fois commencé, se poursuivrait presque aussi bien que dans le bouillon ordinaire. L'addition d'un peu d'urée ou d'acide urique, de sucre de canne serait favorable. Le Bacille se développe à la surface et dans la partie supérieure du liquide ; puis les éléments tombent et se réduisent en un dépôt floconneux. D'après Cache (3), ce dépôt pourrait montrer de nombreux filaments ramifiés, semblables à ceux des *Cladothrix*. L'activité de ces cultures est moindre que chez celles en bouillon.

D'après Hugounenq et Doyon (4), cependant, les cultures sur liquide d'Outchinski ne donneraient pas de bons résultats, même avec addition de peptones.

Le liquide suivant paraît beaucoup mieux convenir (Jirou) :

Eau	1000 grammes.
Glucose	20 —
Asparagine	5 —
Urée	3 —
Lactate d'ammoniaque	2gr,50
Sulfate de soude	2 grammes.
Chlorure de sodium	2 —
Phosphate de potasse	2 —
Chlorure de calcium	0gr,1
Sulfate de magnésie	0gr,1

Le milieu, légèrement alcalin, est stérilisé par un chauffage de deux heures à 100°; il prend alors une légère teinte jaunâtre.

Le *Bacille de la diphtérie* y donne, en vingt-quatre à quarante-huit heures, un trouble net, diffus. Par ensemencements successifs, le trouble apparaît plus tôt. Après, il se forme un voile blanc très léger à la surface et de petits grumeaux dans le liquide. En n'ensemençant que la surface, le voile léger se montre d'abord, après vingt-quatre heures; le trouble ne se produit qu'ultérieurement.

Le microbe conserve bien sa vitalité sur ce milieu; il n'y meurt qu'après cinquante à soixante jours.

Il y prend des formes assez spéciales. Après vingt-quatre heures, on trouve beaucoup de petites plaques de formes rondes; on dirait des coccus. Plus tard, les formes normales deviennent plus abondantes; les pseudo-coccus s'allongent et donnent de courts bâtonnets; ils ne disparaissent cependant jamais entièrement, même dans les cultures de un à deux mois. Portés de ce milieu sur les milieux albuminoïdes habituels, les colonies se montrent presque exclusivement formées de Bacilles normaux.

(1) SACHAROFF, Simplification du diagnostic bactériologique de la diphtérie (*Ann. de l'Inst. Pasteur*, VI, 1892, p. 451).

(2) OUTCHINSKY, Recherches sur la nature des poisons de la diphtérie et du choléra (*Arch. de méd. expér.*, V, 1893, p. 293).

(3) CACHE, De la culture du Bacille de la diphtérie croissant en fils ramifiés (*Centralbl. für Bakt.*, XXIX, 1901, p. 975).

(4) HUGOUNENCQ et DOYON, Les milieux de culture définis (*Soc. de Biol.*, 18 avril 1896).

PROPRIÉTÉS BIOLOGIQUES

La composition chimique a été donnée par Nishimura (p. 49). Elle n'indique rien de spécial. Aronson (1) signale de 3 à 5 p. 100 de matières grasses.

Vitalité. — Le *Bacille de la diphtérie* jouit d'une grande vitalité. Des cultures sur sérum peuvent donner un développement dans un nouveau milieu, après six mois et même un an. Roux et Yersin en ont obtenu des cultures de fausses membranes sèches conservées pendant dix-huit mois à l'obscurité. L'action des diverses conditions de milieu sur les propriétés du microbe sera étudiée plus loin.

Virulence. — La virulence du microbe obtenu des produits diphtériques est loin d'être toujours identique; elle varie, au contraire, dans de très larges limites.

Évaluation de la virulence. — On l'évalue par l'inoculation de cultures jeunes aux animaux d'expérience, principalement au cobaye. On se sert d'une culture en bouillon, faite à 37°, âgée de vingt-quatre heures. Un Bacille *très virulent* tue le cobaye de 300 à 400 grammes en vingt-quatre à trente-six heures à la dose de un demi à 1 centimètre cube en injection sous-cutanée, quelquefois même en moins de temps. Un Bacille *moyennement virulent* le tue en deux à cinq jours; un Bacille *peu virulent* le tue en huit ou dix jours, parfois plus, ou ne détermine même plus qu'une simple lésion locale, un œdème suivi d'escarre. Il est même des Bacilles qui n'occasionnent qu'un très minime œdème au point d'inoculation, ou même rien du tout: leur virulence est nulle ou presque.

Pour apprécier le degré de virulence, il est nécessaire de n'inoculer que des cultures jeunes ou rajeunies. Une vieille culture peu virulente gagne en activité lorsqu'on la rajeunit.

La virulence est donc, ici aussi, une propriété contingente du microbe qui diminue ou même disparaît lorsque certaines conditions de vie interviennent. Elle est liée d'une façon intime à la production de substances toxiques dont il sera parlé plus loin.

L'âge de la culture est un facteur important pour la virulence. Au fur et à mesure qu'une culture vieillit, surtout en présence d'air en abondance, on voit son activité diminuer; dans un courant d'air, elle peut même complètement disparaître au bout d'un certain temps. Cette atténuation ne s'obtient pas régulièrement, mais se produit tantôt vite, tantôt lentement; on peut même ne pas observer de décroissance régulière et graduelle. Les milieux de culture influent sur cette atténuation, un Bacille cultivé sur gélose perd plus facilement et plus vite son activité qu'en culture sur sérum ou dans le bouillon. Pour le développement et la conservation de la virulence, Nicolas et Arloing (2) recommandent surtout le bouillon additionné de 1/10e de sérum de cheval. Enfin, bien des conditions qui seront étudiées plus loin, entre autres la dessiccation à l'air, la lumière, agissent aussi comme agents d'atténuation.

(1) Aronson, Zur Biologie und Chemie der Diphteriebacillen (*Arch. für Kinderheilk.*, XXX, 1902, p. 23).

(2) Nicolas et Arloing, Influence de certains milieux nutritifs sur la vitalité et la virulence du Bacille de Loeffler (*Soc. de Biol.*, 1899, n° 39, p. 991).

Souvent, cependant, cette atténuation d'une culture peut n'être qu'apparente. Une vieille culture, qui, de très active au début, se montre peu dangereuse pour le cobaye, peut ne pas présenter l'atténuation véritable, acquise, et, par conséquent, transmissible par hérédité ; il suffit de la rajeunir pour voir reparaître la virulence première. De là, la nécessité de toujours réensemencer une culture pour pouvoir se prononcer exactement sur son degré d'activité.

En absence d'air, ou presque, la virulence se conserve plus longtemps sans se modifier sensiblement. Il est possible de conserver longtemps l'activité d'une culture en la gardant en ampoules scellées et la renouvelant seulement par période de quelques mois.

Martin (1) attribue, au point de vue de la virulence, une grande importance aux différences de forme des éléments bacillaires, différences qui ont été précédemment signalées (p. 824). Pour lui, les Bacilles courts, disposés souvent parallèlement les uns aux autres, seraient très bénins ; les Bacilles moyens, peu toxiques ; les Bacilles longs, intriqués, les plus toxiques. Il faut reconnaître que la pratique est loin de démontrer l'exactitude et la constance de ces données, les Bacilles longs, enchevêtrés, se montrant parfois peu virulents, même inactifs, et des formes courtes, où les bâtonnets se disposent souvent parallèlement, pouvant se montrer très actives. Du reste, un même Bacille, se développant sur sérum ordinaire, peut revêtir la forme courte, et, sur sérum de Loeffler, la forme longue.

De nombreuses expériences démontrent qu'un Bacille qui a totalement perdu sa virulence, dont l'inoculation au cobaye, même à fortes doses, ne détermine plus rien, ou simplement un minime œdème au point d'inoculation, ne peut plus guère récupérer sa virulence. Roux et Yersin sont toutefois parvenus à un résultat positif en associant à une culture très atténuée, ne déterminant chez le cobaye qu'un petit œdème de deux ou trois jours de durée, une culture de *Streptocoque de l'érysipèle* de très grande virulence. De telles associations peuvent se rencontrer accidentellement dans la nature, dans le cas d'angine, par exemple, ce qui explique bien des cas d'infection.

Il n'en est plus de même avec un Bacille dont la virulence est simplement diminuée, s'est atténuée sous une influence affaiblissante quelconque.

On arrive, d'après Bardach (2), à lui faire récupérer sa virulence par une série de passages continus sur des animaux de moins en moins sensibles. Le *Bacille diphtérique* ne se développant qu'au point d'inoculation, il est nécessaire de prendre la semence dans la lésion locale, l'œdème qui se produit à cet endroit. A chaque passage, on fait avec cette semence une nouvelle culture qui sert à l'inoculation suivante. Bardach dit être ainsi arrivé à de très bons résultats en se servant du chien : d'autres ont observé les mêmes phénomènes avec le cobaye ou avec des petits oiseaux, moineau ou pinson par exemple, plus sensibles encore que ce dernier animal. Le meilleur moment pour la semence dans la lésion locale est de la sixième à la huitième heure.

(1) Martin, Examen clinique et bactériologique de deux cents enfants entrés au pavillon de la diphtérie à l'hôpital des Enfants-Malades (*Ann. de l'Inst. Pasteur*, VI, 1892, p. 335).
(2) Bardach, Études sur la diphtérie (*Ann. de l'Inst. Pasteur*, IX, 1895, p. 40).

Le même procédé peut servir à exalter la virulence d'une culture déjà très active; le tableau suivant, emprunté à Funck (1), peut donner une bonne idée d'une telle opération; il faut cependant faire remarquer qu'on est loin d'obtenir toujours et régulièrement les mêmes bons résultats.

PASSAGE.	COBAYE.	POIDS en grammes.	DOSE INJECTÉE.	SUITES.
1er	I	300	Injection de 0gr,1 de culture.	Mort en 24 heures.
2e	II	274	— 0gr,05 —	Mort en 24 heures.
3e	III	309	— 0gr,01 —	Mort en 36 heures (ne pèse plus que 259 gr.).
4e	IV	345	— 0gr,005 —	Mort en 2 jours (ne pèse plus que 293 gr.).
5e	V	276	— 0gr,001 —	Mort en 9 jours (ne pèse plus que 241 gr.).

Trump (2) obtient une récupération très nette de virulence, en injectant au cobaye 0cc,35 de toxine diphtérique en même temps que 5 centimètres cubes de culture de vingt heures du microbe très atténué et même totalement dépourvu de virulence. La mort survient. En mettant en culture de la sérosité prise au point d'inoculation du microbe, il récolte un microbe qui tue déjà le cobaye sans intervention de toxine et qui se renforce par passages successifs.

L. Martin (3) recommande surtout l'emploi de la méthode des sacs de collodion introduits dans la cavité péritonéale de lapins (p. 356).

Avec des Bacilles déjà bien virulents, il devient possible, par les inoculations en série ou par les cultures en sacs de collodion introduits dans la cavité péritonéale, d'exalter d'une façon notable la virulence première et d'obtenir ainsi des microbes très actifs.

L'*atténuation* complète de la virulence conduit à l'obtention d'un Bacille qui ne se distingue du *Bacille diphtérique* actif que par le manque de toute activité; les autres caractères, caractères de morphologie et de cultures surtout, sont identiques. Ce n'est plus qu'un véritable microbe saprophyte; il n'est pas possible de faire reparaître sa virulence par les procédés connus jusqu'ici. Nous reviendrons plus loin sur cette question, à propos du *Bacille pseudo-diphtérique.*

Action des conditions de milieu. — Le *Bacille de la diphtérie* peut être considéré comme résistant assez bien aux diverses conditions qui influent d'ordinaire sur la vitalité des microbes.

Dessiccation. — Roux et Yersin avaient déjà signalé que des fausses membranes desséchées, placées à l'obscurité, pouvaient encore donner des cultures après plusieurs mois. Reyes (4), opérant sur des cultures, dit avoir vu les Bacilles soumis à la dessiccation ordinaire en présence

(1) Funck, Manuel de sérothérapie antidiphtérique, 1895, p. 18.

(2) Trumpp, Diphterie oder Pseudodiphteriebacillen im Empyemeiter (*Centralbl. für Bakt.*, XX, 1896, p. 721).

(3) L. Martin, Production de la toxine diphtérique (*Ann. de l'Inst. Pasteur*, XII, 1898, p. 26).

(4) Reyes, Sulla vitalita del Bacille della difterite fuori dell'organismo (*Ann. d'Igiene sper.*, V, 1895, p. 501).

de l'air résister jusqu'à cent jours dans la poussière; ils sont au contraire tués en quelques heures, quarante-huit heures au plus, par la dessiccation complète en présence d'acide sulfurique. Valagussa (1) a conservé desséchées des cultures qui, après vingt-six mois, ont pu être revivifiées et étaient encore très virulentes pour le cobaye

Lumière. — Ledoux-Lebard (2) a constaté que la lumière diffuse n'agit pas sur la vitalité, tandis que l'insolation directe stérilise tout à fait les cultures en quelques jours. Les rayons les moins réfrangibles du spectre n'ont presque pas d'action bactéricide. D'après Gehrke (3), l'insolation directe tue en deux à six heures les Bacilles des cultures ordinaires; les vieilles cultures en bouillon ne meurent qu'après un ou deux jours.

Chaleur. — Les cultures sont rapidement tuées par une température de 58° en milieu humide; desséchées auparavant à une température de 40° environ, elles pourraient résister à une température d'environ 100° pendant au moins trois quarts d'heure.

Action des antiseptiques. — D'une façon générale, le *Bacille de Loeffler* est très sensible à l'action des antiseptiques. Chantemesse et Widal (4), en expérimentant sur des fils de soie immergés dans une culture virulente, desséchés à l'étuve, puis plongés pendant une, deux, trois minutes dans le liquide à essayer, ont observé des résultats intéressants. Ils ont vu que l'eau de chaux, le tannin en solution aqueuse à 2 p. 100, l'acide phénique à 1 p. 100, l'acide borique à 4 p. 100, le sulfate de cuivre et le sulfate de zinc à 0,5 p. 100, l'eau naphtolée, l'eau salolée, l'acide salicylique en solution alcoolique à 5 p. 100, le perchlorure de fer en solution aqueuse à 1 p. 100, le biiodure de mercure à 0,5 p. 100 seul ou additionné d'acide tartrique ou d'acide citrique, ne montraient aucun résultat utile après trois minutes. L'alcool à 95° ne détruit pas le microbe. Le mélange suivant s'est montré particulièrement actif et stérilise presque immédiatement : 25 grammes de glycérine sont ajoutés à 5 grammes d'acide phénique pur et 20 grammes de camphre; le liquide est agité et mis pendant dix minutes dans un bain-marie d'eau bouillante ; par le repos, il se divise en deux couches qui se mélangent par agitation; il n'est que faiblement caustique.

D'Espine et Marignac (5) disent que le sublimé à 1 p. 1000, l'acide salicylique à 1 p. 2000, le jus de citron pur, peuvent entraver les cultures. Toutefois, il faut remarquer que le sublimé n'est pas actif pour les fausses membranes.

Barbier (6) regarde comme stérilisant sûr la solution de phénol sulforiciné à 20 p. 100.

Loeffler (7) signale comme très bactéricide pour les cultures et don-

(1) Valagussa, Sulla resistenz del B. difterico all'essicamento (*Riv. di Clin. pediatr.*, 1909, VII, n° 4).

(2) Ledoux-Lebard, Action de la lumière sur le Bacille diphtérique (*Arch. de méd. expér.*, 1894).

(3) Gehrke, Ueber das Verhalten der Diphteriebacillen in Wassern und auf Nährsubstraten unter dem Einflusse des direkten Sonnenlichtes. Thèse de Greifswald, 1896.

(4) Chantemesse et Widal, Note sur le traitement antiseptique de la diphtérie (*Revue d'hygiène*, XI, 1889, p. 609).

(5) D'Espine et Marignac, *Revue méd. de la Suisse romande*, 1890.

(6) Barbier, Traitement de la diphtérie (*France méd.*, janvier 1892).

(7) Loeffler, Die locale Behandlung der Rachendiphterie (*Deutsche med. Wochenschr.*, 1891, n° 42).

nant de bons résultats pour le traitement local de la diphtérie, comme adjuvant du traitement sérothérapique, la mixture suivante :

Menthol..	10 grammes.
A dissoudre dans :	
Toluol..	36 centimètres cubes.
Alcool absolu..	60 —
Perchlorure de fer liquide..	4 —

Conserver dans des flacons jaunes bouchés à l'émeri. L'application se fait au moins toutes les deux heures, au moyen d'un tampon d'ouate imbibé du remède, après avoir un peu nettoyé la gorge.

Produits formés dans les milieux. — On ne connaît que bien peu de choses sur les diverses modifications que le *Bacille de la diphtérie* fait subir aux différents milieux dans lesquels il se développe.

Acidité. — Il y a d'abord dans les bouillons production d'acide. L'acidité est probablement due à la formation d'acide lactique aux dépens des hydrates de carbone contenus dans le milieu, surtout glucoses provenant du glycogène de la viande. L'acidité peut persister si l'air ne se renouvelle pas ou si le milieu renferme certaines substances, de la glycérine en particulier; elle est remplacée par une réaction alcaline lorsque l'air se renouvelle, ce qui cause la fermentation plus rapide des hydrocarbonés; cette réaction est due à la production d'ammoniaque qui se combine plus ou moins à des composés constituants du milieu, forme en particulier du phosphate ammoniaco-magnésien qui peut même se déposer en cristaux.

On peut constater la présence d'une petite quantité d'hydrogène sulfuré.

Indol. — La présence d'indol dans les bouillons de culture a été signalée par Palmirski et Orlowski (1) ; elle a été, au contraire, niée par d'autres observateurs. Elle peut ne se manifester que très tard, un ou deux mois. On obtient même parfois la réaction avec simple addition d'acide sulfurique, comme dans la réaction du rouge de choléra, ce qui indique la présence dans le milieu d'une petite quantité de nitrite alcalin formé par le microbe.

TOXINE DIPHTÉRIQUE.

La particularité de beaucoup la plus importante est la production, dans les milieux où le microbe se développe, de produits toxiques spéciaux auxquels sont dus les effets qu'il détermine dans les organismes vivants. On désigne leur ensemble sous le nom de *toxine diphtérique* ; par extension, on applique la même dénomination aux liquides où a vécu le *Bacille de la diphtérie*, privés par filtration ou autre procédé de tout élément vivant, liquides qui contiennent les produits toxiques diffusibles qu'a formés le microbe.

Loeffler avait soupçonné l'existence de ce *poison diphtérique*, en remarquant que, chez l'homme atteint de diphtérie ou chez l'animal inoculé expérimentalement, le Bacille ne se retrouvait que dans la lésion

(1) Palmirski et Orlowski, Ueber die Indolreaktion in Diphteriebouillonkulturen (*Centralbl. für Bakt.*, XVII, 1895, p. 358).

locale, fausse membrane ou œdème du point d'inoculation, et pas ailleurs, pas dans le sang ou les organes en particulier, comme dans d'autres infections *totius substantiæ*. Il avait ainsi été conduit à admettre que l'action nocive pourrait bien être due à une substance toxique sécrétée par le Bacille, pouvant même manifester ses effets après la disparition de celui-ci.

Roux et Yersin ont démontré l'existence de ce poison dans leurs belles recherches (1) qui leur ont permis d'affirmer que « a diphtérie est une intoxication causée par un poison très actif formé par le microbe dans le lieu restreint où il se développe ».

Ils ont démontré qu'en filtrant sur une bougie de porcelaine une culture dans le bouillon restée sept jours à l'étuve, on obtient un liquide très limpide, légèrement acide, qui ne contient plus de microbes, puisqu'il laisse stériles tous les milieux de culture auxquels on l'ajoute. Ce liquide, inoculé à d'assez fortes doses, une trentaine de centimètres cubes, dans la cavité péritonéale d'un cobaye, ou dans les veines auriculaires d'un lapin, détermine, après quelques jours, des troubles importants, souvent suivis de mort. Chez le cobaye, un des symptômes les plus frappants est une forte dyspnée ; chez le lapin, ce sont des paralysies qui débutent par le train postérieur et s'étendent ensuite à tout le corps ; souvent ces derniers animaux présentent une diarrhée profuse très commune dans la diphtérie infectieuse de l'homme.

Les cultures plus âgées possèdent une toxicité plus grande. La quantité de culture filtrée nécessaire pour déterminer la mort est beaucoup moins forte. La mort arrive plus rapidement. Les lésions sont identiques à celles que l'on observe chez les animaux qui ont succombé à l'inoculation du *Bacille de la diphtérie*. Elles seront étudiées plus loin. On ne retrouve, naturellement, jamais de *Bacilles de la diphtérie* dans les organes des animaux morts à la suite d'inoculation de cultures bien filtrées.

En usant de méthodes spéciales de préparation et en prenant comme semence un Bacille très virulent naturellement ou à virulence exaltée, et surtout un Bacille reconnu comme très toxigène, comme il sera indiqué ci-après, il est possible d'obtenir un liquide d'une activité beaucoup plus grande. La mort des cobayes survient en quelques jours ou même en quelques heures, quinze à vingt heures même, après inoculation de doses bien moindres d'un centimètre cube, un dixième, un centième, un deux-centième de centimètre cube et même moins. Comme ce liquide toxique, cette *toxine diphtérique*, comme on dit habituellement, a une grande importance pour l'immunisation des animaux destinés à fournir le sérum antidiphtérique, il est utile de donner des détails sur sa préparation.

Préparation de la toxine diphtérique. — La première condition essentielle pour obtenir un liquide très actif est d'employer pour la culture un *Bacille diphtérique* bien toxigène.

Tous les *Bacilles diphtériques* ne donnent pas de toxine bien active, il s'en faut. Des Bacilles bien virulents, isolés de fausses membranes, peuvent donner une toxine faible ou même inactive ; inversement, des Bacilles peu virulents peuvent être bien toxigènes. Il n'y a donc pas de proportionnalité exacte entre la virulence et le pouvoir toxique, comme

(1) Roux et Yersin, *loc. cit.*, p. 824.

Roux l'a fait remarquer depuis longtemps; cependant on peut admettre que souvent les Bacilles à virulence élevée possèdent un pouvoir toxique notable.

Pour préparer une bonne toxine, il faut user d'un Bacille qui se montre très toxigène. On a intérêt à prendre une race particulière, qui s'est montrée très active à cet égard. Les races spéciales entretenues dans les laboratoires conviennent très bien.

La plupart des services usent aujourd'hui de la race connue sous le nom de *Bacille américain*, *Bacille de Park-Williams*, isolé à New-York d'une angine, en 1894, par Anna Williams. Il présente des caractères de culture un peu particuliers. Dans le bouillon, le trouble est peu prononcé et disparaît vite; il se forme un voile blanc, sec, grenu, plus ou moins épais, qui tombe vers le quatrième jour et peut se reformer plusieurs fois.

Pour végéter vigoureusement, ce qu'on doit rechercher, le Bacille doit être entraîné par une série de cultures successives dont les ensemencements se font au mieux tous les deux ou trois jours, jusqu'à ce que l'on obtienne rapidement un beau voile.

Avec le *Bacille américain* bien entraîné, en se servant d'un bouillon suffisamment alcalinisé, on obtient un voile épais; le bouillon qui devient trop vite acide ne donne qu'un voile mince. La première de ces condition fait obtenir une toxine plus active.

Il n'est toutefois pas possible de se baser sur le fait de la formation ou de la non-formation de voile dans les cultures en bouillons, des expérimentateurs prétendant que les Bacilles ne formant pas de voile ne sont pas suffisamment toxiques. On obtient fréquemment des toxines très actives avec un microbe qui ne forme pour ainsi dire pas de voile, et des produits peu actifs avec des cultures où le microbe a donné des voiles superbes.

Lorsqu'on cultive un Bacille bien actif dans du bouillon de bœuf ou de veau peptonisé à 2 p. 100, légèrement alcalinisé, on remarque que le liquide devient acide dans les premiers jours, puis qu'au bout d'un temps plus long il redevient alcalin. Tant que la culture est acide, son pouvoir toxique est peu considérable; il est nécessaire d'en injecter une grande quantité au cobaye pour déterminer chez lui l'intoxication diphtérique aiguë et la mort. L'acidité dépend pour une bonne partie de la présence de sucres dans le milieu; il est donc à recommander d'employer des matériaux dépourvus de sucres, peptones et viande surtout; c'est la raison pour laquelle le bouillon à la viande de cheval ne convient souvent pas à cause de la présence de glycogène donnant vite une forte acidité. Lorsque la réaction alcaline a réapparu, la puissance toxique a beaucoup augmenté. Après sept ou huit jours à l'étuve à 37°, le liquide légèrement acide ne détermine rien chez le cobaye à la dose de 2 à 4 centimètres cubes; il faut employer des doses véritablement massives, une trentaine de centimètres cubes, en injection dans le péritoine, pour tuer l'animal en cinq ou six jours. Cette dernière dose de liquide préparé avec une culture âgée de quarante-deux jours tue le cobaye en une dizaine d'heures. Des doses bien moindres, de 1/5 de centimètre cube à 2 centimètres cubes, inoculées sous la peau, tuent les cobayes dans un intervalle de temps variant de trois jours à vingt-quatre heures.

En somme, l'acidité du milieu paraît être la condition qui nuit surtout

à la production de substance toxique par le microbe. Toutes les causes qui favorisent la production d'acide dans la culture sont défavorables pour la production d'un liquide bien actif, et inversement. Aussi, au fond, le but de la plupart des procédés recommandés est d'empêcher plus ou moins cette formation d'acide au début des cultures ou de fixer l'acide dès qu'il est produit pour l'empêcher d'agir. On arrive ainsi, au moyen de divers artifices, à une production plus rapide et plus abondante de substance active.

Lorsqu'on arrive à empêcher l'acidité de se produire, la formation de toxine est beaucoup plus rapide et plus abondante. Les cultures faites dans de bonnes conditions peuvent atteindre leur maximum en six à huit jours. Au début, la marche du développement de la toxine est à peu près parallèle à celle des produits alcalins; puis le pouvoir toxique peut ensuite diminuer en même temps que l'alcalinité augmente encore (1).

Pour une rapide production de toxine, il paraît important de tenir les cultures en un repos parfait.

Toutefois, dans cette question d'acidité, tout ne dépend pas uniquement du milieu; le microbe lui-même peut être mis en jeu. Il est des races ou variétés qui donnent plus facilement de l'acide que d'autres dans un même milieu; l'expérience démontre que, pour obtenir de bonne toxine, il faut de préférence choisir ces dernières (2).

On peut avoir avantage à exalter la virulence et le pouvoir toxigène du Bacille dont on veut se servir. On y parvient en le faisant passer plusieurs fois par le cobaye, par inoculation sous-cutanée, reprenant de la matière d'ensemencement dans la sérosité de l'œdème formé à l'endroit de la piqûre (p. 835), ou bien en employant la méthode des sacs de collodion introduits dans la cavité péritonéale de lapins (p. 356). On a aussi préconisé dans ce but l'utilisation de l'effet favorisant de certaines associations microbiennes, en faisant des cultures mixtes. Gibier (3) et Hilbert (4) ont signalé l'influence favorable du *Streptocoque*; Finck (5), dans mon laboratoire, celle d'un *Cladothrix*. Il ne semble pas qu'on puisse tirer des résultats pratiques de ces indications.

Procédé de Roux et de Yersin. — Roux et Yersin ont remarqué que la toxicité du liquide augmentait plus rapidement et plus régulièrement quand la culture se faisait en présence d'air fréquemment renouvelé. Pour y arriver, on se sert avantageusement de ballons à fond plat munis d'une ou deux tubulures latérales (fig. 282 et 283) dans lesquels on met le bouillon en couche d'une faible épaisseur, 2 à 3 centimètres; dans de tels ballons, d'une capacité suffisante, on peut facilement mettre de 400 à 500 centimètres cubes de bouillon. Ces ballons, fermés par un tampon d'ouate, sont stérilisés à l'autoclave à 120°, puis

(1) Cobett, Contribution à l'étude de la physiologie du Bacille diphtérique (*Ann. de l'Inst. Pasteur*, XI, 1897, p. 251).

(2) Roussel, Quelques procédés pour la production de la toxine diphtérique. Thèse de Nancy, 1900.

(3) Gibier, Description d'un procédé permettant d'obtenir une toxine diphtérique extratoxique (*Soc. de Biol.*, 1897, p. 393).

(4) Hilbert, Ueber Steigerung der Giftproduction der Diphteriebacillen bei Symbiose mit Streptokokken (*Zeitschr. für Hygiene*, XXIX, 1898).

(5) Finck, De l'augmentation de toxicité des cultures diphtériques par association au Bacille de Loeffler d'une espèce du genre Actinomyces (*Journ. de physiol.*, 1902, p. 515).

ensemencés avec une culture rajeunie et portés à l'étuve à 37°. Après vingt-quatre heures, lorsque le développement a commencé et que le bouillon est nettement troublé, on place dans l'orifice du col, par-dessus le tampon d'ouate, un bouchon de caoutchouc muni d'un tube de verre relié à un flacon barboteur par où se fait l'aspiration d'air (fig. 282). L'interposition du flacon barboteur est nécessaire pour éviter l'évaporation du liquide de culture. La tubulure latérale du ballon est reliée à une trompe à eau qui fait l'aspiration. Les différents tubes du flacon et du ballon sont munis de tampons d'ouate destinés à éviter toute contamination de la culture par l'air. Toutes les parties de l'appareil sont du reste stérilisées à l'autoclave avant leur ajustement. On règle facilement le courant d'air à l'aide du débit de la trompe et de vis de pression qu'on place sur les tubes de caoutchouc. On peut opérer en même temps sur un assez grand nombre de ballons que l'on relie à des tubulures latérales d'une rampe de cuivre réunie à la trompe; il est ainsi possible de préparer d'un seul coup de grandes quantités de toxine diphtérique. Après trois semaines, un mois au plus, la culture est suffisamment riche en substance active; son activité n'augmente du reste plus sensiblement, elle tendrait plutôt à diminuer. Ces cultures achevées sont filtrées sur bougie Chamberland, dans l'appareil représenté figure 107, page 267, ou tout autre similaire.

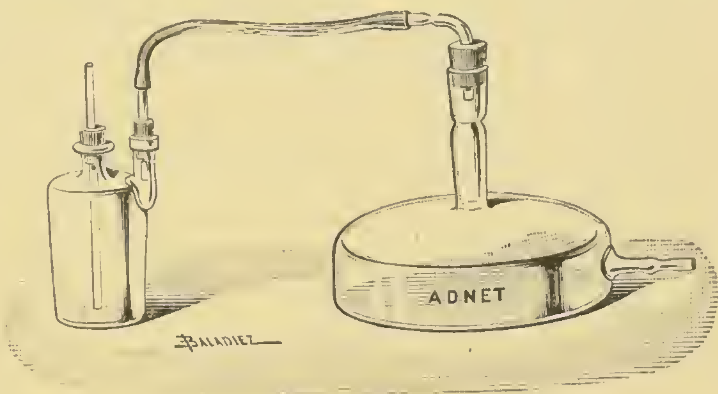


Fig. 282. — Ballon Fernbach pour courant d'air.

Dans ces conditions, un Bacille bien virulent donne une toxine qui tue un cobaye de 300 grammes en moins de quarante-huit heures à la dose de 1/10e de centimètre cube en inoculation sous-cutanée.

La forme de ballon représentée figure 283 permet un renouvellement plus complet de l'air à la surface de la culture. Une des tubulures latérales est reliée au barboteur, l'autre à la trompe; l'orifice du col est obturé par un bouchon de caoutchouc plein.

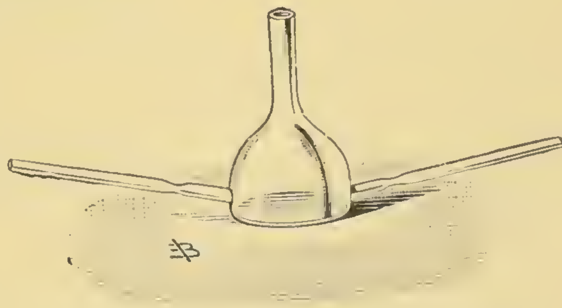


Fig. 283. — Ballon à deux tubulures.

Cette méthode facile et sûre de préparer la toxine diphtérique présente toutefois des inconvénients. C'est d'abord le temps assez considérable que la culture met à gagner une activité suffisante, puis surtout l'embarras que peut causer l'installation d'un grand nombre d'appareils dans les étuves ordinaires.

Premier procédé de Spronck. — Spronck (1) attribue à la présence de glucose dans les bouillons la difficulté et la lenteur que peut avoir

(1) Spronck, Sur les conditions dont dépend la production du poison dans les cultures diphtériques. Moyen simple de préparer une toxine très active (*Ann. de l'Inst. Pasteur*, IX, 1895, p. 758).

le Bacille diphtérique à produire de la substance toxique. Il explique même par le fait que la viande de cheval contient beaucoup plus de glucose que celle de bœuf ou de veau le peu de toxicité des bouillons à la viande de cheval signalé par Smirnow (1). Il conseille, pour éliminer le glucose, de faire usage d'une viande qu'on aura laissée vieillir autant que possible, même jusqu'à commencement de putréfaction, et d'avoir soin d'employer une peptone dépourvue de glucose. Il recommande en outre d'ajouter au bouillon 0gr,5 p. 100 de chlorure de sodium, une petite quantité de carbonate de chaux. D'après lui, en usant d'un Bacille très virulent, cultivé dans des bouillons ordinaires, on obtient au bout de treize jours une toxine qui tue un cobaye de 500 grammes dans les quarante-huit heures à la dose de 1/10e de centimètre cube.

J'ai mis très fidèlement en œuvre le procédé de Spronck; en partant d'un Bacille tuant le cobaye en vingt-trois heures à la dose de un demi-centimètre cube, qui donnait par la méthode de Roux une toxine tuant en trente-six heures, à la dose de 1/10e de centimètre cube, un cobaye de 300 grammes, je n'ai pu obtenir qu'une toxine infiniment moins active que cette dernière, ne tuant le cobaye qu'en six à huit jours.

Procédé de Nicolle. — Nicolle (2) dit obtenir toujours une toxine active en opérant de la façon suivante : de la viande de bœuf tué le matin même est haché et mise à macérer une nuit à une température de 10° à 12° (500 grammes de viande pour un litre d'eau). La macération, additionnée de 2 p. 100 de peptone et de 0,5 de sel, est portée à l'ébullition, puis filtrée, alcalinisée assez fortement et chauffée dix minutes à 120°; puis filtrée à nouveau et répartie dans des vases quelconques à raison de 1 ou 2 litres par vase. Le tout est stérilisé à 115°.

Avec un Bacille virulent, après cinq jours à 37°, sans courant d'air, la culture filtrée tue un cobaye de 500 grammes en un peu plus de quarante-huit heures, à la dose de 1/10e de centimètre cube; après sept jours, elle le tue en moins de quarante-huit heures.

En employant un Bacille tuant en vingt heures un cobaye de 430 grammes et donnant une toxine très active par le procédé de Roux, je n'ai pu obtenir à diverses reprises, par ce procédé, que des toxines plus faibles, ne tuant le cobaye, de 400 grammes environ, qu'en soixante, soixante-dix heures et plus; de plus, cette toxine a déterminé beaucoup d'œdème.

Procédé de Park et Williams. — Park et Williams (3) conseillent d'employer des bouillons de culture bien alcalinisés. Les meilleurs résultats seraient obtenus avec du bouillon qui, après une addition de soude, alors qu'il est *bien neutre* au tournesol, est additionné de 7 centimètres cubes de solution normale de soude par litre. Ceci correspond à un bouillon donnant une réaction alcaline nette, avec de la bonne teinture de tournesol.

Procédé de L. Martin (*Procédé de choix*). — L. Martin (4) recom-

(1) Smirnow, Ueber die Behandlung der Diphterie mit küntslichen dargestellten Antitoxinen (*Berlin. klin. Wochenschr.*, 1895, n° 30).

(2) Nicolle, Préparation de la toxine diphtérique (*Ann. de l'Inst. Pasteur*, X, 1896, p. 333).

(3) Park et Williams, The production of Diphteriatoxin (*Journ. of exper. Med.*, I. 1896, p. 164).

(4) Martin, Production de la toxine diphtérique (*Ann. de l'Inst. Pasteur*, XII 1898, p. 26).

mande tout spécialement le *bouillon de panse*, obtenu comme il a été dit page 231, avec des estomacs de porcs ; la fermentation de la viande de veau a permis de détruire toutes traces de matières sucrées.

Le liquide sera disposé, en couche de 5 à 8 centimètres de hauteur, dans de larges ballons, et ensemencé en surface, la matière d'ensemencement devant flotter sur le liquide. Après un jour ou deux à l'étuve à 37°, le voile apparaît, puis s'épaissit ; il tombe d'ordinaire vers le quatrième jour, puis il s'en reforme un nouveau qui tombe définitivement vers le sixième jour. C'est du cinquième au sixième jour d'habitude que le liquide a son maximum de toxicité et qu'il convient de le filtrer ; vers le huitième, l'activité diminue déjà.

On doit protéger le voile formé en laissant les cultures dans le plus grand repos, évitant même toutes les trépidations, qui pourraient le faire tomber avant le moment voulu et nuire à la bonne réussite de l'opération.

Ce bouillon donne de très bons résultats avec le *Bacille américain.* La toxine obtenue a souvent une haute virulence, pouvant tuer le cobaye de 250 grammes en quinze à vingt ou quarante heures à des doses de 1/100e, 1/200e et même 1/500e de centimètre cube.

Toutefois, le procédé, mis en œuvre très fidèlement, donne aussi des insuccès ; il est bon d'en être prévenu.

Deuxième procédé de Spronck. — Spronck (1) a préconisé la décoction de Levure. Un kilogramme de Levure de commerce, non de Levure de brasserie, est délayé dans 5 litres d'eau ; le tout est mis à bouillir pendant vingt minutes en agitant constamment avec une spatule. La décoction est versée dans un ou plusieurs vases cylindriques et laissée en repos pendant vingt-quatre heures. La Levure se sépare en laissant au-dessus d'elle un liquide louche qu'on décante. A ce liquide légèrement acidulé, on ajoute par litre 5 grammes de sel marin et 20 grammes de peptone Witte de Rostock ; on neutralise avec de la soude et l'on ajoute encore par litre 7 centimètres cubes d'une solution de soude normale. On chauffe, filtre sur papier, répartit dans des matras et stérilise à 120°.

Procédés plus simples. — On réussit souvent bien en employant la simple méthode suivante, basée sur l'addition de craie seule : du bouillon de viande de bœuf peptonisée à 2 p. 100, additionné d'une petite quantité de craie (10 grammes par litre environ), est réparti dans des ballons de 1 à 2 litres, stérilisé à 115°, puis ensemencé avec un Bacille virulent et simplement placé à l'étuve à 37°. Le bouillon, filtré après un mois ou six semaines, peut tuer un cobaye de 340 à 400 grammes en trente-six heures à la dose de 1/10e de centimètre cube. Cette observation démontre bien que la production d'acide dans le milieu est la cause réelle de la lenteur et de la difficulté dans la formation de substance active.

On obtient aussi d'excellents résultats en se servant de la macération de viande de Loeffler (*Fleisch-infus-pepton*, p. 231) préparée avec 2 p. 100 de peptone Chapoteaut, qu'on alcalinise à la soude jusqu'à réaction alcaline très nette au papier de tournesol, ou bien à laquelle on ajoute, après neutralisation aussi exacte que possible, 7 centimètres cubes de solution normale de soude.

(1) Spronck, Préparation de la toxine diphtérique ; suppression de l'emploi de la viande (*Ann. de l'Inst. Pasteur*, XII, 1898, p. 701).

Conservation de la toxine diphtérique. — Après filtration sur bougie Chamberland, qui se fait avec les appareils figurés pages 266 et 267, on peut répartir le liquide dans des ballons ou des tubes bien remplis que l'on scelle au chalumeau et que l'on garde à l'abri de la lumière, mais surtout de l'air qui exerce sur la toxine une action destructive bien marquée.

Ou bien, on ajoute au liquide de culture 3 grammes pour 1000 d'acide phénique ou de tricrésol, on filtre sur papier épais pour séparer les corps bactériens, en grande partie au moins, et on conserve dans un flacon à robinet sous une couche de vaseline liquide stérilisée ou de toluol, épaisse de 4 à 5 centimètres au moins, à l'abri de la lumière. Dans des liquides primitivement clairs, il peut se former de légers louches qui ne sont pas dus à une végétation microbienne, mais paraissent formés par du phosphate de chaux.

Ces produits peuvent ainsi se conserver pendant assez longtemps, quelques mois même, sans perdre sensiblement de leur activité (1).

Cependant, on observe un affaiblissement graduel avec le temps, sous des influences que l'on ne connaît pas encore. Le tableau suivant, d'Arrhenius et Madsen (2), peut en donner une idée, bien que l'on ne puisse pas se baser d'une façon absolue sur les chiffres donnés, qui sont sujets, suivant les cas, à des variations en plus ou en moins.

Date.	Dose mortelle minima.	Toxicité.
	c. c.	
20 octobre 1897	0,07	100,0
4 janvier 1898	0,096	72,8
11 mai 1898	0,112	62,3
27 août 1898	0,145	48,3
13 septembre 1898	0,149	47,1
17 octobre 1898	0,2	35,0

Essai de la toxine diphtérique. — On essaie la valeur de la toxine en l'inoculant sous la peau d'un cobaye, à doses faibles et croissantes, à l'état de dilution dans de la solution physiologique ou de l'eau stérilisée. On s'est servi au début de cobayes du poids de 500 grammes environ et on recherchait combien il fallait de toxine pour tuer l'animal en trente à quarante heures. On prend aujourd'hui des cobayes de 250 grammes environ. Il est nécessaire de prendre des cobayes qui n'ont jamais subi d'influence de cette nature, qui n'ont pas servi antérieurement à des expériences quelconques, surtout à des inoculations de produits diphtériques ou de sérum antidiphtérique, ou proviennent même de parents qui ont été soumis à l'action de tels produits. Il faut des cobayes absolument neufs. On injecte à plusieurs individus des doses progressivement décroissantes. Avec les toxines supposées assez faibles, on part de 1/10ᵉ de centimètre cube et on fait 1/20ᵉ, 1/50ᵉ et 1/100ᵉ; avec les toxines très fortes, on peut commencer 1/10ᵉ, puis faire 1/50ᵉ, 1/100ᵉ, 1/200ᵉ et 1/500ᵉ. On observe les symptômes qui seront décrits plus loin (p. 852). La mort survient plus ou

(1) Abba, Sulla durata del potere tossico e antetossico nella tossina e nella antitossina difterica (*Riforma medica*, XIV, février 1898).

(2) Arrhenius et Madsen, Le poison diphtérique (*Acad. roy. des sc. et lettres de Danemark*, 1904, et *Centralbl. für Bakt.*, 1ᵗᵉ Abth., Originale, XXXVI, 1905).

moins tôt. On peut considérer comme *dose mortelle minima* la plus petite dose qui occasionne la mort de l'animal en un laps de temps déterminé, trente ou quarante heures par exemple, ou quatre à cinq jours pour les auteurs allemands. Cette dose mortelle minima sert de base pour l'évaluation de l'activité du produit.

Tous ces détails montrent qu'on est encore loin de pouvoir obtenir toujours et régulièrement une toxine très active. Même en se mettant dans les conditions qui semblent bonnes pour réussir, on constate souvent des insuccès que l'on ne peut pas expliquer. D'où il faut conclure qu'il est absolument nécessaire d'essayer soigneusement l'activité d'une toxine chaque fois qu'on en prépare pour l'usage ou qu'on veut utiliser une toxine datant de quelques mois.

Propriétés de la toxine diphtérique. — Les effets physiologiques de la toxine diphtérique seront étudiés plus loin (p. 852).

On n'est pas encore bien fixé sur la nature de la substance toxique ainsi produite. Roux et Yersin pensent qu'elle doit être rapprochée des diastases. Elle en présente en effet une partie des propriétés. On la considère comme une toxalbumine.

Elle est très sensible à l'action de la chaleur ; son activité est modifiée et d'autant plus profondément que la température est plus élevée et plus longtemps prolongée. La toxine chauffée pendant deux heures à 58°, même à l'abri de l'air, perd de son pouvoir toxique et ne détermine plus que de l'œdème chez le cobaye, même à la dose d'un centimètre cube; dans les mêmes conditions, chauffée à 65°, elle n'est presque plus toxique; à 70°, elle est inoffensive; chauffée pendant vingt minutes à 100°, on peut en injecter 35 centimètres cubes dans les veines d'un lapin sans lui causer aucun malaise immédiat. Un tel liquide chauffé n'est cependant pas inoffensif; les animaux qui en reçoivent de fortes doses maigrissent lentement, peuvent présenter des symptômes de paralysie, surtout dans les membres postérieurs, et finissent par succomber, souvent dans un véritable état de cachexie, après cinq ou six mois. C'est probablement le résultat de la complexité de cette toxine, qui doit renfermer plusieurs principes à effets différents, dont un ou quelques-uns seulement sont influencés par la chaleur.

Comme on l'observe pour la diastase pancréatique, l'activité de la toxine diphtérique diminue en présence des acides; il ne faut même qu'une petite quantité d'acide pour en diminuer notablement l'énergie. L'acide lactique, l'acide tartrique produisent plus d'effet que l'acide phénique, l'acide borique; les deux premiers réduisent l'action de la toxine à de simples effets locaux, plus ou moins intenses ; les deux seconds ne font que retarder la mort. Il n'y a pas ici modification de la substance toxique, car la neutralisation fait reparaître, à peu de chose près, l'activité première.

En présence de la lumière, elle s'altère à l'air et peut devenir inoffensive; à l'abri de l'air, elle ne s'altérerait pas à la lumière.

Elle est rapidement rendue inoffensive par l'ozone; tous les oxydants (permanganate de potasse, hypochlorites), l'iode diminuent la toxicité.

L'alcool précipite la substance toxique de ses solutions. Comme on l'observe avec les enzymes dans les milieux albumineux, toute la substance toxique est contenue dans le précipité albumineux que donne

l'addition d'alcool. Mais l'action prolongée de l'alcool finit par l'altérer ainsi que des précipitations successives.

Elle est entraînée par certains précipités minéraux qui se forment dans le liquide, le précipité de phosphate tribasique de chaux, par exemple. Avec un même bouillon, on peut faire des précipitations successives sans arriver à priver totalement le liquide de substance active ; toutefois, les précipités sont de moins en moins toxiques; son adhérence aux précipités est très évidente : elle n'en diffuse que peu à peu, comme cela se produit avec les corps microbiens.

Elle est précipitée par les réactifs qui précipitent les albumoses, surtout le sulfate de soude et le sulfate d'ammoniaque en solutions saturées.

Ce sont là des caractères qui la rapprochent beaucoup des diastases.

Ce sont les recherches de Roux et Yersin qui ont donné sur cette substance les renseignements les plus complets.

Le liquide filtré, la toxine brute, lorsqu'on l'évapore sur l'acide sulfurique, dans le vide à une température de 25°, donne un résidu très complexe puisqu'il renferme les éléments du bouillon inattaqués ou modifiés par la vie microbienne, qui, dissous dans un peu d'eau, se montre extrêmement toxique; il contient sous un petit volume la matière active d'une grande quantité de culture. L'alcool à 80° dissout une partie de cet extrait sec ; le résidu donné par son évaporation, brun, d'odeur agréable, est inoffensif pour le cobaye. La substance toxique, insoluble dans l'alcool, se retrouve en entier dans la partie insoluble de ce réactif. Cette partie, dissoute dans un peu d'eau, est extrêmement active sur les cobayes et les lapins; l'alcool fort précipite la substance toxique de cette solution sous forme de flocons grisâtres. Dans un litre de culture filtrée, il peut y avoir environ un dixième de milligramme de toxine pure.

Si l'on soumet l'extrait dissous dans l'eau à la dialyse, on remarque que la substance toxique dialyse très lentement; ce qui peut expliquer la production de l'action locale après l'inoculation et la lenteur de l'apparition des effets généraux.

La précipitation par l'alcool affaiblissant toujours notablement l'activité des diastases, il vaut mieux recourir à l'entraînement par les précipités salins. Celui qui réussit le mieux ici est le phosphate de chaux. Roux et Yersin recommandent de recourir à une précipitation fractionnée, en ajoutant goutte à goutte et en agitant une solution de chlorure de calcium; la double réaction se produit avec les phosphates contenus dans le milieu. Après chaque précipitation, le pouvoir toxique du liquide filtré diminue de plus en plus ; le liquide soumis à une série de précipitations successives ne perd cependant pas complètement sa toxicité.

Le précipité phosphatique est très toxique pour le cobaye, plus à l'état humide que desséché. Le précipité sec peut être conservé longtemps à l'air, être chauffé à 70°, sans que son activité soit diminuée; humide, il est beaucoup plus sensible à ces actions. Traité par l'alcool à 80°, il ne cède presque rien ; l'alcool évaporé laisse cependant percevoir l'odeur agréable signalée précédemment. Ce précipité ne contient naturellement qu'une minime proportion de substance active ; 2 centigrammes du précipité humide tuent un cobaye en quatre jours, en inoculation sous-cutanée ; ces 2 centigrammes correspondent à un poids

de matière organique inférieur à deux dixièmes de milligramme, et cette matière organique renferme certainement encore des matières inertes à côté de la substance active.

Brieger et Fraenkel (1) ont obtenu des résultats très semblables à ceux de Roux et Yersin, en étudiant la substance toxique produite par le *Bacille de la diphtérie* dans les cultures. Ils l'obtiennent en précipitant à 30°, par le sulfate d'ammoniaque, les bouillons de culture filtrés sur porcelaine. Le sel qui peut rester dans le précipité est éliminé par la dialyse, jusqu'à ce que l'eau qui se sépare ne précipite plus le chlorure du baryum. Le résidu est desséché dans le vide, à 40°. C'est alors une substance amorphe, floconneuse, très légère, d'un blanc éclatant, possédant beaucoup des réactions des albumines solubles. Elle est très soluble dans l'eau, ne précipite pas par l'ébullition, par l'acétate de plomb, par l'acide nitrique étendu, même à chaud; elle précipite, au contraire, par l'acide carbonique en solution chargée, par les acides minéraux concentrés, l'acide acétique, l'acide phénique, le sulfate de cuivre, le nitrate d'argent, le bichlorure de mercure. Elle ne donne aucun résultat positif avec les réactifs des alcaloïdes ; par contre, elle donne d'une façon très nette la réaction du biuret, celle de la xanthoprotéine et la coloration rouge avec le réactif de Millon, caractéristiques des matières albuminoïdes vraies, ce qui permet d'affirmer que c'est un dérivé de l'albumine. Pour eux, c'est une *toxalbumine* provenant de la transformation des albumines du milieu. Ces auteurs disent même avoir pu déterminer sa composition centésimale, qui se rapproche beaucoup de celle de la sérine; ils lui attribuent la formule suivante :

C	47,35
H	7,13
Az	16,33
S	1,39
O	29,89

Toutefois, la substance qu'ils ont obtenue présente une toxicité notablement moindre que celle du produit isolé par Roux et Yersin. Tandis que ces derniers tuent un cobaye par l'inoculation sous la peau de deux dixièmes de milligramme de leur substance toxique, les auteurs allemands doivent, pour arriver au même résultat, inoculer 10 milligrammes de celle qu'ils ont obtenue par leur méthode. Ce qui semble démontrer qu'ils n'isolent par leur procédé qu'un mélange complexe, ne contenant qu'une petite proportion de matière réellement toxique.

Dans les bouillons de cultures atténuées, on rencontre, d'après eux, une substance albuminoïde présentant les mêmes réactions, mais non toxique. Ils lui attribuent la constitution suivante :

C	49
H	7
Az	15
S	2,23
O	26,97

(1) Brieger et Fraenkel, Untersuchungen über Bacteriengifte (*Berlin. klin. Wochenschr.*, 1890, nos 11 et 12).

Wassermann et Proskauer (1) sont arrivés à de semblables résultats. Mais pour eux on n'obtiendrait pas de cette façon le poison diphtérique pur; le précipité serait en grande partie formé d'albumoses du milieu de culture ayant entraîné mécaniquement la substance toxique.

Brieger et Boer (2) ont décrit récemment une autre méthode, plus pratique, pour obtenir la toxine diphtérique. La toxine est traitée par le double de son volume d'une solution de chlorure de zinc à 1 p. 100. Le précipité zincique, lavé avec soin, est fortement agité avec une solution de bicarbonate d'ammoniaque à 3 p. 100, ou à 6 p. 100 pour les grandes quantités de liquide, solution dont on prend un volume égal au volume de toxine mis en œuvre. Ensuite, on ajoute une quantité suffisante de phosphate d'ammoniaque (ce qui peut précipiter déjà une partie de toxine) jusqu'à redissolution complète, et qu'il ne reste qu'un trouble dû au phosphate de zinc. On laisse déposer ce fin précipité blanc, on filtre sur papier dur pour recueillir le précipité métallique, on lave bien et l'on sature le filtratum avec du sulfate d'ammoniaque. Le précipité qui se forme alors renferme quantitativement la substance toxique diphtérique. On redissout ce précipité dans l'eau, on l'agite avec du sulfate de soude finement pulvérisé; on peut ainsi, en procédant à plusieurs reprises, éliminer les peptones qui ont été éventuellement précipitées avec la toxine, peptones qui se trouvent encore en mélange dans le filtrat du précipité formé par le sulfate de soude avec une plus ou moins grande quantité de toxine. Quand on opère sur des liquides riches en albumine, on n'arrive pas par ce procédé à éliminer complètement l'albumine. On peut cultiver le Bacille diphtérique sur les milieux dépourvus d'albumine; les auteurs, à l'exemple de Guinochet, donnent la préférence à l'urine humaine dialysée. On n'obtient ainsi que peu de toxine, mais elle est dépourvue d'albumine et de peptones.

La toxine pure ainsi obtenue ne présente pas les réactions des albumines ni des peptones. Elle est optiquement inactive et se comporte d'une façon tout à fait passive envers les réactions habituelles de la chimie organique. L'alcool, l'éther, l'acétone la décomposent rapidement; de même les acides, même l'acide carbonique; tandis que dans les solutions alcalines faibles ses propriétés biologiques ne se modifient pas. Les agents oxydants, comme le permanganate de potasse, même en solutions extrêmement faibles et très faiblement alcalinisées, la décomposent presque instantanément, tandis que les substances faiblement réductrices, comme le sulfate de fer, en solutions faiblement alcalines, ne modifient pas sa puissance, même après vingt-quatre heures.

Les corps bacillaires dont on a extrait complètement la toxine diffusible par une agitation de plusieurs heures (dix-huit à vingt) avec une solution concentrée de chlorure ammonique, ou, comme le conseille Kossel (3), par un lavage au carbonate de soude ou à la lessive de soude, renferment encore une substance active qui, inoculée à faible dose sous la peau des cobayes, détermine en quarante-huit heures des accidents locaux de suppuration et de nécrose tout spéciaux.

(1) Wassermann et Proskauer, Ueber die von den Diphteriebacillen erzeugten Toxalbumine (*Deutsche med. Wochenschr.*, 1891, n° 17).

(2) Brieger et Boer, Ueber die Toxine der Diphterie und der Tetanus (*Deutsche med. Wochenschr.*, 1896, n° 49).

(3) Kossel, Zur Kenntniss des Diphteriegiftes (*Centralbl. für Bakt.*, XIX, 1896, p. 977).

Gamaléia (1), se basant sur l'action qu'exercent la pepsine et la trypsine sur le poison diphtérique, le considère comme une nucléo-albumine.

Ces deux ferments, la trypsine surtout, le décomposent et en séparent une substance à effets toxiques éloignés ; les cobayes ne succombent plus à l'intoxication aiguë par la toxine diphtérique, mais maigrissent, deviennent cachectiques et meurent après un temps assez long. Ce poison cachectisant, qui est détruit par le chauffage en présence d'alcalis fixés, paraît être une nucléine. D'après lui, la plupart des substances microbiennes toxiques actuellement connues seraient des nucléo-albumines ou des nucléines.

Cette action destructive de la pepsine en solution acide doit certainement être regardée comme un des procédés de défense de l'organisme (2).

Guinochet (3), de son côté, en cultivant le *Bacille de la diphtérie* dans de l'urine dépourvue de matières albuminoïdes, démontre que la substance toxique ne dérive pas nécessairement des albuminoïdes.

Les recherches d'Oulchinsky (4), sur des cultures faites avec sa solution minérale (p. 227), prouvent aussi que la substance toxique ne provient pas de la décomposition des albuminoïdes du milieu, mais est formée synthétiquement par le microbe, dans le corps cellulaire même.

Le poison diphtérique ne se rencontre pas seulement dans les milieux de culture du microbe, mais il y a été trouvé aussi dans les humeurs d'animaux infectés expérimentalement, urine, exsudats séreux, etc. Brieger et Wassermann (5) ont vu mourir en trois et dix jours, avec les symptômes caractéristiques de l'intoxication par le poison diphtérique, deux cobayes auxquels ils avaient inoculé respectivement 5 centimètres cubes et $0^{cc},5$ de sérum sanguin d'animal diphtérique filtré sur porcelaine.

D'après Ehrlich (6), le *Bacille diphtérique* produirait dans les bouillons de culture deux sortes de substances qu'il nomme les unes *toxines*, les autres *toxones*. Ces deux groupes jouissent de la propriété de neutraliser ou fixer de l'antitoxine, mais ont une virulence bien différente ; la virulence de la toxone est très peu marquée ou même nulle. Dans les bouillons filtrés, au contact de l'oxygène, les toxines se transforment en *toxoïdes* qui fixent aussi de l'antitoxine, mais ne présentent pas de pouvoir pathogène ou seulement très peu. Les idées très originales d'Ehrlich sur la constitution et le mode d'action des toxines en général, et particulièrement de la toxine diphtérique, ont été exposées précédemment (p. 145).

D'après Madsen (7), si les toxines seules possèdent la propriété de

(1) Gamaléia, Action des ferments solubles sur le poison diphtérique (*Soc. de Biol.*, 20 février 1892).

(2) Charrin et Lefèvre, Action de la pepsine sur la toxine diphtérique (*Soc. de Biol.*, 31 juillet 1897).

(3) Guinochet, Contribution à l'étude de la toxine du Bacille de la diphtérie (*Soc. de Biol.*, 1892, p. 480).

(4) Outchinsky, Nature des poisons de la diphtérie et du choléra (*Arch. de méd. expér.*, 1893).

(5) Brieger et Wassermann, *Centralbl. für Bakt.*, XII, 1892, p. 725.

(6) Ehrlich, Ueber die Konstitution des Diphteriegiftes (*Deutsche med. Wochenschr.*, 1898, n° 38).

(7) Madsen, La constitution du poison diphtérique (*Ann. de l'Inst. Pasteur*, XIII, 1899, p. 569 et 801).

causer une intoxication aiguë, les autres éléments jouissent aussi de propriétés pathogènes; les toxones, en particulier, produisent des paralysies tardives.

Des recherches de Cruveilhier (1) paraissent bien démontrer qu'à côté de la toxine ou des toxines diffusibles il existe une *endotoxine diphtérique* très adhérente aux corps bacillaires, à l'égard de laquelle l'antitoxine ordinaire n'a pas d'action.

INOCULATION EXPÉRIMENTALE

Le *Bacille de la diphtérie* est pathogène pour la plupart des animaux d'expérience.

Les *rats* et les *souris* sont réfractaires et résistent aux inoculations de doses considérables de produits virulents.

Inoculation au cobaye.

Le *cobaye* est excessivement sensible; c'est l'animal de choix, le véritable réactif expérimental du *Bacille de la diphtérie* ou de ses produits toxiques. Aussi est-il important de bien connaître chez lui les symptômes de la diphtérie expérimentale; ils ont, du reste, été décrits magistralement par Roux et Yersin.

Inoculation sous-cutanée. — C'est le procédé qui donne les résultats les plus constants et les plus comparables. Suivant la virulence de la culture employée, l'injection sous la peau d'un demi-centimètre cube à 1 centimètre cube de bouillon de culture récente tue le cobaye dans un intervalle de temps qui varie entre vingt-quatre heures et deux ou trois jours pour les cultures virulentes, moins même pour certains types doués d'une haute virulence. A l'autopsie, les lésions consistent en un enduit membraneux, grisâtre, limité au point d'inoculation, sorte de petite fausse membrane, en un œdème gélatineux, plus ou moins étendu, des parties avoisinantes, et en une dilatation générale des vaisseaux qui se traduit par la congestion des ganglions et des organes internes, surtout des capsules surrénales absolument gorgées de sang. Le plus souvent, on trouve un épanchement séreux ou séro-sanguinolent de la plèvre et du péricarde; parfois le tissu pulmonaire est splénisé.

Inoculation intrapéritonéale. — Les résultats obtenus sont plus lents; les cobayes meurent quatre ou cinq fois moins vite, avec la même dose de culture, qu'en inoculation sous-cutanée.

Inoculation sur les muqueuses. — En excoriant les muqueuses du pharynx, de la conjonctive, de la vulve, ou en les brûlant légèrement avec une baguette de verre chauffée, et touchant la place lésée avec un fil de platine chargé de culture, on observe la production de fausses membranes typiques. En trachéotomisant un cobaye, lui excoriant la muqueuse trachéale et l'ensemençant de cette manière, on observe la production d'un véritable croup avec fausses membranes; la plaie faite se referme vite; au fur et à mesure que les fausses membranes se

(1) Cruveilhier, De l'existence d'une endotoxine dans le Bacille de Loeffler nettement distincte de la toxine diphtérique (*Soc. de Biol.*, 1909, LXVI, p. 1029).

développent dans la trachée, la respiration devient de plus en plus gênée et bruyante, la mort survient en trois jours.

Le simple badigeonnage sur une muqueuse saine ne produit rien.

Inoculation au lapin.

Inoculation sous-cutanée. — Le lapin résiste en général plus que le cobaye. L'injection de cultures de virulence moyenne ne produit même souvent que des accidents locaux, une nécrose des tissus au point d'inoculation. Avec des cultures virulentes, il faut injecter de 2 à 4 centimètres cubes pour le tuer. La mort survient en quatre ou cinq jours. On trouve un œdème très étendu au point d'inoculation, un gonflement des ganglions de la région, une congestion de l'épiploon et du mésentère avec de petites ecchymoses le long des vaisseaux; le foie est jaune, friable, en état de dégénérescence graisseuse; l'épanchement pleurétique est exceptionnel; les poumons sont presque toujours intacts.

Inoculation intraveineuse. — A la suite d'une injection de 1 centimètre cube de culture, les lapins meurent en général en moins de soixante heures. Ils présentent une congestion générale des organes abdominaux, le gonflement des ganglions, une néphrite aiguë et très souvent l'altération du foie citée plus haut.

Inoculation sur les muqueuses. — On observe les mêmes résultats que chez le cobaye. L'inoculation trachéale après trachéotomie s'obtient encore plus facilement; l'affection produite rappelle tout à fait le croup de l'homme : respiration bruyante et pénible, gonflement des ganglions du cou et des tissus environnants, trachée congestionnée et tapissée de fausses membranes.

Inoculation au chien et autres animaux.

D'après Roux et Yersin, le *chien* est assez sensible au *Bacille de la diphtérie.* Un chien vigoureux pesant 8 kilogrammes est mort en trois jours à la suite d'inoculation sous-cutanée d'une culture sur sérum. Un œdème se développa au point d'inoculation; l'animal tomba dans la stupeur, devint incapable de faire un mouvement et mourut après une paralysie complète. Un autre chien inoculé avec la même culture dans la trachée présenta un gonflement du cou avec prostration complète et mourut le quatrième jour tout à fait paralysé. A l'autopsie, il n'y avait pas de fausses membranes dans la trachée. Ces deux chiens présentèrent avant leur mort un ictère très marqué.

Klein a réussi, en inoculant des *chats*, à les tuer en six et treize jours. Il aurait aussi fait périr deux *vaches* par l'inoculation de 1 centimètre cube de culture sous la peau de l'épaule. Toutes deux présentèrent des vésico-pustules sur les trayons. Le sang ne contenait pas de *Bacille de la diphtérie*; le liquide des pustules et le lait en ont donné des cultures, dans un des cas; des chats nourris avec ce lait auraient pris la diphtérie.

Les *pigeons* succombent en moins de soixante heures à l'inoculation sous-cutanée ou intramusculaire de 1 centimètre cube de culture virulente. On trouve un petit enduit grisâtre au point d'inoculation et un œdème gélatineux des tissus. Ils succombent encore avec des doses inférieures à un demi-centimètre cube, mais se rétablissent le plus

souvent lorsqu'ils sont inoculés avec 1/5 de centimètre cube. On peut aussi leur donner la diphtérie trachéale avec fausses membranes. Les *poules* se comportent de la même façon.

Les *petits oiseaux* sont, de tous les animaux, les plus sensibles à l'action du microbe de la diphtérie ; on réussit à tuer le moineau ou le pinson avec des Bacilles peu virulents pour le cobaye.

Inoculation de cultures anciennes.

Lorsqu'on inocule des cultures anciennes, conservées à l'air, mais à l'abri de la lumière, pendant quelques mois, la mort tarde à venir ; on observe alors des symptômes différents de ceux qui se passent lorsque les animaux succombent à une intoxication rapide. Dans ce cas, il se produit souvent de véritables *paralysies diphtériques*. On les observe surtout chez le lapin. La paralysie débute d'ordinaire par le train postérieur ; elle peut être rapidement progressive et envahir tout le corps en un ou deux jours, l'animal meurt par arrêt de la circulation et du cœur. Ou bien elle reste limitée pendant un certain temps aux pattes postérieures et ne gagne que lentement la partie antérieure; la mort survient avec ou sans convulsions. Le pigeon guérit plus facilement de ces paralysies que le lapin.

A l'autopsie du lapin paralytique, on trouve, quand la maladie n'a pas été trop longue, de la congestion des ganglions et des divers organes, un état graisseux du foie ; quelquefois la consistance de la moelle épinière a paru diminuée.

Il n'y a cependant pas ici atténuation régulière des cultures; de telles cultures, en effet, reprennent toute leur activité quand on les renouvelle.

Inoculation de la toxine diphtérique.

L'inoculation du bouillon de culture filtré sur porcelaine, de la toxine diphtérique réellement active, produit chez les animaux sensibles les mêmes effets que les inoculations des cultures vivantes; il en est de même des produits plus ou moins purs obtenus en traitant la toxine par les procédés exposés plus haut.

Les *rats* et les *souris* sont tout aussi réfractaires à la toxine qu'aux cultures ; l'injection de doses de toxine capables de tuer rapidement un chien ne détermine chez eux aucun malaise. Roux et Yersin n'ont pu faire périr une souris blanche qu'avec une dose suffisante pour tuer quatre-vingts cobayes.

Le *cobaye* est également ici l'animal de choix. Selon la virulence et surtout la puissance toxigène de la culture employée pour préparer la toxine, la dose nécessaire pour déterminer rapidement chez le cobaye l'intoxication diphtérique aiguë varie entre 1/100 ou 1/10 de centimètre cube (Voy. p. 844), 1/5 de centimètre cube, 1 centimètre cube. En inoculation sous-cutanée, selon les doses employées et l'activité du produit, la mort survient en moins de vingt-quatre heures ou en deux ou trois jours avec des symptômes identiques à ceux que l'on observe avec la culture vivante. Il se forme rapidement un œdème au point d'inoculation ; après douze, vingt-quatre heures ou plus, l'animal est hérissé, prostré, a la respiration haletante ; les membres postérieurs se

paralysent, la respiration devient irrégulière, puis s'arrête; la mort survient. L'inoculation intraveineuse de doses plus faibles de moitié détermine les mêmes effets.

A l'autopsie, on remarque aussi partout la dilatation vasculaire signalée plus haut; les ganglions sont congestionnés, les reins et les capsules surrénales sont foncés, gorgés de sang noir; il y a des ecchymoses le long des vaisseaux; les plèvres et le péricarde contiennent un épanchement séreux plus ou moins abondant.

Chez les cobayes qui n'ont pas reçu de doses mortelles, on observe souvent des parésies typiques, avec abaissement de la température et persistance de la sensibilité. Ces troubles peuvent guérir complètement ou laisser des traces.

L'animal inoculé maigrit très vite et peut perdre en vingt-quatre heures le quart ou le tiers de son poids. Dans les cas où la mort ne survient pas rapidement, il se produit un état cachectique prononcé, l'animal perd plus de la moitié de son poids en cinq ou six jours; en le soupesant à la main, on a la sensation de tenir un cobaye en carton.

De très petites doses, un dixième au moins de la dose mortelle, en injection sous-cutanée, déterminent un œdème hémorragique du tissu cellulaire de la peau. On peut se servir de cette réaction pour démontrer la présence de faibles quantités de toxine diphtérique dans un produit.

Les *lapins* succombent comme les cobayes aux inoculations sous-cutanées ou intraveineuses de 1 à 4 centimètres cubes; on observe les mêmes phénomènes paralytiques qu'avec les cultures vivantes.

Les lésions du myocarde sont fréquentes chez les animaux intoxiqués. Molard et Regaux (1) ont montré que les lésions pouvaient aller jusqu'à la destruction complète de la substance musculaire.

Roger et Bayeux (2), Coppez (3), Morax et Elmassian (4) ont obtenu avec la toxine diphtérique appliquée sur les muqueuses, même en l'absence de toute lésion, des lésions locales, parfois de véritables fausses membranes, ce qui peut faire attribuer à l'intoxication une part réelle dans la production de ces phénomènes dans la diphtérie.

Le système nerveux est souvent profondément atteint, comme le montrent les myélites obtenues par Enriquez et Hallion (5).

L'ingestion de toxine s'est toujours montrée inoffensive, même à fortes doses.

Chez le lapin comme chez le cobaye, des doses très faibles ou de la toxine provenant de cultures peu virulentes ne déterminent qu'un œdème souvent très minime au point d'inoculation. L'animal semble se rétablir après quelques jours; fréquemment, cependant, il maigrit et meurt cachectique après un temps variable, pouvant même présenter

(1) Molard et Regaud, Lésions du myocarde dans l'intoxication aiguë par la toxine diphtérique (*Ann. de l'Inst. Pasteur*, XI, 1897, p. 97).

(2) Roger et Bayeux, Sur le rôle de la toxine diphtérique dans la formation des fausses membranes (*Soc. de Biol.*, 13 mars 1897).

(3) Coppez, Des altérations cornéennes dans la diphtérie de l'œil et du traitement local par le sérum (*Revue gén. d'ophtalm.*, 1897, p. 197).

(4) Morax et Elmassian, Action de la toxine diphtérique sur les muqueuses (*Ann. de l'Inst. Pasteur*, XII, 1898, p. 210).

(5) Enriquez et Hallion, Le système nerveux dans l'intoxication diphtérique expérimentale (*Soc. de Biol.*, 15 janvier 1898).

des symptômes de paralysie. L'amaigrissement peut être extrême et très rapide, la perte de poids considérable.

Les *pigeons* et surtout les *petits oiseaux* meurent rapidement avec des doses très minimes.

Nocard a tué en trois jours un *mouton* auquel il avait inoculé sous la peau 5 centimètres cubes de toxine active; l'animal est mort avec des accès de dyspnée.

La *vache* est sensible au poison diphtérique; Roux et Nocard ont observé la mort à la suite de l'inoculation de 5 centimètres cubes de toxine active. La *chèvre* supporte mal également une dose un peu forte.

Le *cheval* supporte mieux la toxine. Parfois l'injection sous-cutanée de 2 à 5 centimètres cubes de toxine très active ne détermine qu'un œdème local qui se dissipe en quelques jours et un peu de fièvre. L'*âne* réagit beaucoup plus; Roux a vu un ânon de six mois succomber à la suite d'une injection sous-cutanée de 1 centimètre cube de toxine. Nous reviendrons du reste sur l'action de la toxine chez ces animaux à propos de la production de l'immunité.

Behring établit de la façon suivante l'échelle de sensibilité à la toxine des principales espèces animales qui servent d'ordinaire aux expériences, en commençant par les animaux les plus sensibles :

1° La chèvre.	4° Le mouton.	7° Le chien.
2° Le cheval.	5° Le lapin.	8° Le rat.
3° La vache.	6° Le cobaye.	9° La souris.

Introduite dans l'organisme, la toxine diphtérique n'agit pas immédiatement, comme le ferait un toxique minéral ou alcaloïdique ; il y a toujours, au contraire, une véritable période d'incubation pendant laquelle l'état de l'animal reste normal ou à peu près. C'est ce qui peut faire penser que la toxine n'agit pas directement par elle-même, mais plutôt secondairement, en provoquant peut-être des dédoublements de matières albuminoïdes, d'où viendraient alors les vrais produits toxiques, probablement de nature albumosique (Sidney Martin).

L'activité d'une toxine diphtérique est évaluée comme il a été dit plus haut (p. 844).

IMMUNITÉ ET SÉROTHÉRAPIE

Immunisation des animaux. — Hoffmann (1) le premier, en 1887, dit avoir observé que des cobayes, inoculés avec des cultures âgées, qui s'étaient atténuées spontanément, se montraient réfractaires à l'inoculation de cultures fraîches de virulence éprouvée. C. Fraenkel (2) a obtenu le même résultat en injectant aux cobayes, avec précautions, de la toxine chauffée quelque temps à 70°; pour lui, cette température détruisait la substance toxique et respectait une substance vaccinante qui l'accompagnait.

Les résultats de Behring (3) sont beaucoup plus complets. Il a pu con-

(1) Hoffmann, Untersuchungen über den Löffler'schen Bacillus der Diphteriae (*Congrès de Wiesbaden*, 1887).

(2) Brieger et Fraenkel, Ueber Immunisierung Versuche bei Diphterie (*Deutsche med. Wochenschr.*, 1890, n° 49).

(3) Behring, Untersuchungen über das Zustandekommen der Diphterie-Immunität bei Thieren (*Deutsche med. Wochenschr.*, 1890, n° 50).

férer l'immunité aux cobayes et aux lapins par divers procédés. D'abord en employant la toxine chauffée à 70°, comme le faisait Fraenkel. Ensuite en inoculant des bouillons de culture âgés de trois semaines additionnés de trichlorure d'iode dans la proportion de 1 p. 500. En injectant à des animaux, déjà inoculés avec du *Bacille de la diphtérie*, diverses substances, du trichlorure d'iode, du chlorure double d'or et de sodium, de l'acide trichloracétique et même de l'acide phénique, ou en injectant préventivement d'une solution à 10 p. 100 d'eau oxygénée. Enfin, il obtenait cette même immunité, fait beaucoup plus important, à la suite de l'injection de l'exsudat pleural, privé de microbes, qu'il recueillait sur les cobayes morts à la suite d'inoculation de cultures virulentes.

Brieger, Kitasato et Wassermann (1) immunisent des cobayes en leur injectant des cultures de diphtérie dans des bouillons faits avec le thymus de veau. Il ne s'y produit que très peu de toxine, que l'on affaiblit encore en chauffant pendant un quart d'heure à 65°-70°.

Roux (2) préfère se servir de toxine pure, injectée à doses très minimes d'abord, puis progressivement croissantes; ou, pour le début au moins, de toxine affaiblie par l'addition de certaines substances, hypochlorites alcalins, hypochlorite de chaux et surtout solutions iodées. On ajoute à la toxine un tiers de son volume de la solution de Gram, au moment même de l'employer, et après quelques instants on injecte le mélange sous la peau. C'est à l'une ou l'autre de ces pratiques de Roux que l'on donne le plus souvent la préférence.

L'immunisation solide des lapins et cobayes, par ces diverses méthodes, est toujours une opération délicate. Il faut procéder avec beaucoup de ménagements, espacer les premières injections, peser fréquemment les animaux et suspendre les injections quand on constate qu'ils diminuent de poids, sans quoi ils deviendraient cachectiques et finiraient par périr.

On peut inoculer d'emblée à un lapin de moyenne taille un demi-centimètre cube du mélange de toxine et de solution de Gram; l'injection peut se faire à l'extrémité de l'oreille, sous la peau de la face interne. Il se produit, quelques heures après l'injection, un œdème assez fort qui disparaît au bout de quelques jours; on renouvelle l'injection et l'on continue ainsi pendant quelques semaines; on peut, après ce temps, diminuer la proportion d'iode pour arriver à donner de la toxine pure dont les doses pourront être progressivement augmentées.

Pawlowsky et Maksutow (3) ont reconnu que l'on obtenait une immunisation plus rapide et un sérum antidiphtérique plus actif en recourant à l'action simultanée de la toxine et de l'antitoxine. On injecte d'abord à un cheval une forte dose de sérum antidiphtérique, puis après, chaque deux jours, des doses élevées de toxine. S'il se produisait une réaction trop forte, on injecterait à nouveau une dose suffisante d'antitoxine avant de reprendre les inoculations de toxine. Par ce procédé, dont la valeur a été confirmée par d'autres, le sérum aurait une valeur antitoxique largement suffisante après quarante à cinquante jours.

(1) Brieger, Kitasato et Wassermann, Ueber Immunität und Giftfestigung (*Zeitschr. für Hygiene*, XII, 1892, p. 254).

(2) Roux et Martin, Contribution à l'étude de la diphtérie (sérumthérapie) (*Ann. de l'Inst. Pasteur*, VIII, 1894, p. 609).

(3) Pawlowsky et Maksutow, Methoden der Immunisierung von Pferden zu Zwecken der Gewinnung der Diphterieheilserums (*Zeitschr. für Hygiene*, XXI, 1896, p. 485).

L'immunisation des grands animaux est généralement plus facile à obtenir. Elle présente un intérêt tout spécial au point de vue de l'obtention de sérum antitoxique.

Le *chien* supporte bien le poison diphtérique; Bardach (1), Aronson, Wernicke (2) ont facilement réussi à en immuniser.

La *chèvre* et le *mouton* sont très sensibles; Behring et Roux remarquent que les chèvres surtout deviennent souvent cachectiques, même longtemps après le début de l'expérience. Ehrlich et Wassermann (3) ont réussi sur les chèvres avec les cultures vivantes et avec la toxine.

La *vache* est aussi très sensible. Nocard et Roux en ont vu succomber une, en cours d'immunisation, à la suite d'une injection de 5 centimètres cubes de toxine. Il faut donc procéder, pour la vache et la chèvre, avec une grande prudence, n'injecter d'abord que de très faibles doses de toxine iodée et ne recourir que tard à la toxine pure, seulement lorsque le sang montre déjà une certaine puissance antitoxique. Pour celles dont on veut réserver le lait, Roux recommande de commencer l'immunisation assez longtemps avant la parturition, car au moment de la mise-bas la sensibilité au poison est encore augmentée.

De l'avis de Roux, le *cheval* est le plus facile à immuniser de tous les grands animaux. Comme cette question d'immunisation du cheval a un grand intérêt au point de vue de l'obtention du sérum antidiphtérique, nous croyons devoir entrer dans quelques détails.

Pour immuniser un cheval, il est préférable de recourir aux inoculations, à doses progressivement croissantes, de toxine de bonne virulence, tuant en quinze à trente heures un cobaye de 250 grammes à la dose de 1/100e de centimètre cube. Nocard (4) a réussi également en se servant de cultures vivantes, mais l'emploi de toxine filtrée est préférable.

L'injection se fait facilement sous la peau de l'encolure ou en arrière de l'épaule avec la technique habituelle. Les premières injections peuvent être faites avec la toxine iodée ou des doses plus faibles de toxine pure. Il est des chevaux qui supportent d'emblée l'injection de 1 centimètre cube de toxine pure, sans présenter d'autres symptômes qu'une réaction fébrile passagère et un œdème local plus ou moins prononcé se dissipant en quelques jours. D'autres paraissent plus éprouvés; aussi est-il préférable, pour tâter en quelque sorte la susceptibilité du sujet, de commencer par une injection de 1 ou 2 centimètres cubes de toxine iodée avant de recourir à la toxine pure. Roux signale la sensibilité particulière d'un cheval qui avait été inoculé, un an auparavant, avec du Pneumocoque. Le tableau suivant, emprunté à Roux, donnera d'excellentes indications sur la marche à suivre pour obtenir un degré suffisant d'immunisation chez le cheval.

Immunisation d'un cheval. — On peut prendre comme modèle la marche suivante, donnée par Roux, au début.

(1) BARDACH, Études sur la diphtérie (*Ann. de l'Inst. Pasteur*, IX, 1895, p. 40).

(2) WERNICKE, Ein experimentelle Beitrag zur Kenntniss des Löfflerschen Diphteriebacillus und zur Blutserumtherapie (*Arch. für Hygiene*, XVIII, 1893, p. 192).

(3) EHRLICH et WASSERMANN, Ueber die Gewinnung der Diphterie-Antitoxin (*Zeitschr. für Hygiene*, 1894).

(4) ROUX, Sérumthérapie de la diphtérie (*Ann. de l'Inst. Pasteur*, VII, 1894, appendice, p. 632).

Cheval de sept ans, du poids de 400 kilogrammes environ ; la toxine tue un cobaye de 500 grammes en quarante-huit heures à la dose de 1/10e de centimètre cube.

1er jour.	Injection de	1/4^{cc}	Toxine iodée au	1/10e	Pas de réaction ni locale ni générale.
2e —	—	1/2^{cc}	—	1/10e	Pas de réaction.
4e, 6e, 8e jour.	—	1/2^{cc}	—	1/10e	—
13e, 14e —	—	1^{cc}	—	1/10e	—
17e jour.	—	1/4^{cc}	Toxine pure.		Léger œdème, sans fièvre.
22e —	—	1^{cc}	—		— —
23e —	—	2^{cc}	—		— —
25e —	—	3^{cc}	—		— —
28e —	—	5^{cc}	—		— —
30e, 32e, 36e jour.	—	5^{cc}	—		— —
39e, 41e jour.	—	10^{cc}	—		— —
43e, 46e, 48e, 50e jour.	—	30^{cc}	—		Œdème assez prononcé, dissipé en 24 heures.
53e jour.	—	60^{cc}	—		—
57e, 63e, 65e, 67e jour.	—	60^{cc}	—		—
72e jour.	—	90^{cc}	—		—
80e —	—	250^{cc}	—		—

En deux mois et vingt jours, ce cheval a reçu 800 centimètres cubes de toxine sans avoir présenté autre chose qu'un œdème local passager et une augmentation de température de 1 degré environ le soir des jours où l'injection de toxine a été copieuse.

En général, l'immunité peut être considérée comme déjà solidement établie quand un cheval supporte une injection de 60 à 70 centimètres cubes d'une toxine active sans présenter autre chose qu'un peu de température et un œdème localisé.

En pratique, il est possible d'employer au début des doses plus fortes que celles citées dans le tableau précédent et surtout d'user plus tôt de la toxine pure.

Le tableau suivant résume la marche de l'immunisation de chevaux, conduite à l'Institut sérothérapique de Nancy, suivant les données de Roux, en utilisant des toxines du Bacille américain, tuant le cobaye de 250 grammes en moins de trente heures à la dose de 1/100e ou 1/200e de centimètre cube.

1er jour.	Inj. de	2^{cc}	de toxine add. de 1^{cc} solut. de Gram.	Très peu d'œdème.	Max.	37°,8
3e —	Injection de	1^{cc}	de toxine pure.	Très peu d'œdème.	Maximum	37°,3
5e —	—	2^{cc}	—	—	—	
7e —	—	3^{cc}	—	Œdème léger.	—	40°,6
9e —	—	5^{cc}	—	Un peu d'œdème.	—	38°,3
12e —	—	5^{cc}	—	—	—	38°
15e —	—	10^{cc}	—	Presque pas d'œdème.	—	37°,8
17e —	—	10^{cc}	—	—	—	—
18e —	—	10^{cc}	—	—	—	—
20e —	—	15^{cc}	—	—	—	38°,4
23e —	—	15^{cc}	—	Peu d'œdème.	—	38°,1
25e —	—	20^{cc}	—	—	—	38°,2
27e —	—	20^{cc}	—	—	—	—
29e —	—	20^{cc}	—	Presque pas d'œdème.	—	37°,8
31e —	—	20^{cc}	—	—	—	—
34e —	—	30^{cc}	—	—	—	—
36e —	—	30^{cc}	—	—	—	—
38e —	—	40^{cc}	—	—	—	38°

40e jour.	Injection de	50cc	de toxine pure.	Presque pas d'œdème.	Maximum	38°,4
42e —	—	60cc	—	—	—	38°,1
44e —	—	70cc	—	—	—	38°,1
46e —	—	80cc	—	—	—	38°,2
48e —	—	90cc	—	—	—	38°,2
50e —	—	100cc	—	—	—	38°,2
52e —	—	100cc	—	—	—	38°,9
53e —	—	100cc	—	—	—	38°,3
54e —	—	100cc	—	—	—	38°,2
—	—		—	—	—	38°,8

Pour les dernières doses, on peut facilement arriver à 120cc, 130cc et même 150cc de toxine.

Arrivés à ce degré d'immunisation, les chevaux supportent impunément des doses beaucoup plus fortes de toxine. A ce moment, leur sérum est généralement suffisamment actif pour être utilisé.

Si les réactions sont fortes, au début surtout, il faut diminuer les doses, rester plus longtemps à la même, espacer un peu plus les inoculations. Ce sont les phénomènes réactionnels qui doivent guider.

Il est, du reste, possible, suivant les cas, de modifier la manière de faire. Ce qui doit servir de guide, faire augmenter ou diminuer les doses et les intervalles des injections, c'est l'état de l'animal et les réactions qu'il présente. A ce point de vue, les chevaux réagissent très différemment; il en est qui font plus facilement de l'œdème et de la température que d'autres; l'absence ou la faiblesse des réactions paraissent être favorables pour le bon succès de l'immunisation. Pour ces raisons, il est possible d'aller plus vite dans un cas que dans l'autre.

En se servant de la méthode de Pawlowsky et Maksutow qui a été indiquée précédemment (p. 855), on pourrait arriver à obtenir en une quarantaine de jours un sérum suffisamment actif.

D'après une expérience de Roux, l'*âne* supporte bien moins que le cheval le poison diphtérique; un ânon de six mois a succombé à l'injection de 1 centimètre cube.

Brieger et Boer disent avoir réussi à immuniser une chèvre et un mouton à l'aide de toxine pure extraite par leur procédé décrit page 848.

Le sérum ainsi obtenu avec la toxine se montre nettement *antitoxique*. Par contre, il n'est pas *bactéricide* et pas ou très peu *agglutinant*. En combinant l'injection de corps microbiens, on arrive à obtenir un sérum jouissant, en outre, de propriétés bactéricides marquées. Le cheval semble être bien réellement ici l'animal de choix (1).

Sérothérapie de la diphtérie. — On a vu précédemment (p. 454) que Héricourt et Richet avait réussi à faire résister à l'infection du *Micrococcus pyosepticus* des lapins auxquels ils avaient injecté, dans le péritoine, du sérum de chiens immunisés à l'égard de ce même microbe. C'est certainement là le véritable début de la sérothérapie. Cette méthode a surtout été mise à l'ordre du jour après les recherches de Behring et Kitasato (2) sur le tétanos et la diphtérie. Ces recherches démontrent que le sérum d'animaux immunisés, mélangé au poison microbien en proportions convenables, neutralise en quelque sorte son action et ceci non seulement *in vitro*, mais dans l'organisme où l'on introduit

(1) Martin, Propriétés du sérum antidiphtérique (*Soc. de biol.*, 1903).

(2) Behring et Kitasato, Ueber das Zustandekommen der Diphterie-Immunität und der Tetanus-Immunität bei Thieren (*Deutsche med. Wochenschr.*, 1890).

le sérum avant l'intoxication; que ce sérum agit aussi bien en outre contre l'infection par le microbe vivant que contre l'intoxication par son poison seul; qu'il possède enfin la propriété de guérir un animal déjà en puissance d'infection. Behring explique cette action par la production dans le sang des animaux immunisés, sous l'influence des produits microbiens, d'une *antitoxine* pouvant s'opposer aux effets de la toxine provenant du même microbe. Behring, Boer, Ehrlich, Wassermann, en 1892 et 1893, annoncent les premiers résultats favorables observés sur des enfants atteints de diphtérie. La communication de Roux au Congrès de Budapest, en 1894, apporta les preuves les plus convaincantes, confirmant les résultats de Behring et de ses collaborateurs. La sérothérapie antidiphtérique était érigée en méthode courante. On trouvera tous les détails utiles dans le mémoire de Roux et Martin (1) déjà cité précédemment, et divers ouvrages parus depuis cette époque, entre autres le *Manuel* de Funck (2).

Le *sérum antidiphtérique* peut être fourni par divers animaux qui sont amenés à un état d'immunisation suffisant.

Il est difficile d'utiliser les animaux de petite taille, lapins et cobayes, lorsqu'on désire une quantité tant soit peu considérable de sérum; ils n'en peuvent fournir qu'un volume très restreint, même en sacrifiant l'animal.

Le chien peut déjà en donner plus. Un chien supporte facilement une saignée de 300 à 400 centimètres cubes suivant sa grosseur, et cela à des périodes assez rapprochées; saignant à blanc, par la carotide, on retire 2 litres et plus de sang.

L'immunisation de la chèvre et de la vache présente un intérêt tout spécial, à cause du passage dans le lait du principe antitoxique (3). Nous avons vu que cette immunisation était délicate à conduire et quelles précautions spéciales il fallait prendre. Nous reviendrons plus loin sur cette question du lait des animaux immunisés.

Le cheval présente des avantages tout particuliers à ce point de vue; aussi est-il plus généralement choisi. Nous avons vu d'abord qu'il était facile de l'amener à un haut degré d'immunisation; de plus, il est possible d'en retirer périodiquement une notable quantité de sang; un cheval de poids moyen, 400 à 500 kilogrammes, peut aisément donner tous les mois, et même plus souvent, au moins 4 litres de sang et facilement 6 litres, fournissant de 3 à 4 litres de sérum. L'opération est des plus simple; elle se fait aseptiquement en suivant les indications données page 234. Enfin les expériences de Roux et Vaillard (4) sur le sérum antitétanique démontrent que le sérum de cheval est de tous le mieux supporté par l'homme.

On ne doit naturellement immuniser dans ce but que des chevaux parfaitement sains, le sérum d'animaux malades pouvant transporter des

(1) Roux et L. Martin, Contribution à l'étude de la diphtérie (*Ann. de l'Inst. Pasteur*, VIII, 1894, p. 609), et Roux, Martin et Chaillou, Trois cents cas de diphtérie traités par le sérum antidiphtérique (*Ibid.*, p. 640).

(2) Funck, Manuel de sérothérapie antidiphtérique. Paris, Carré, 1895.

(3) Ehrlich et Wassermann, Ueber die Gewinnung der Diphterie-Antitoxin (*Zeitschr. für Hygiene*, 1894). et Wassermann, Ueber Concentrirung der Diphterie-Antitoxin aus der Milch immunisierte Thiere (*Ibid.*, XVIII).

(4) Roux et Vaillard, Contribution à l'étude du tétanos (*Ann. de l'Inst. Pasteur*, VII, 1893, p. 64).

germes infectieux ou renfermer des principes nuisibles. Il est surtout important de s'assurer qu'ils ne réagissent pas à la malléine et qu'ils ne sont, par conséquent, pas en puissance de morve. La tuberculose du cheval est rare et se reconnaît du reste par des signes cliniques si nets que Nocard lui-même déclare inutile l'épreuve de la tuberculine.

Il faut prendre de préférence des animaux assez jeunes, de cinq à sept ans, bien portants, vigoureux, de caractère tranquille de préférence; les chevaux âgés présentent plus facilement de fortes réactions qui rendent l'immunisation plus difficile et plus longue à obtenir à un degré suffisant.

Le sérum des chevaux traités comme il a été indiqué dans les tableaux page 857, recueilli quelque temps après la dernière injection, se montre nettement antitoxique. Son maximum d'activité n'est atteint que dix ou onze jours après la dernière injection, comme le montrent bien les recherches de Salomonsen et Madsen (1); la saignée faite plus tôt peut ne donner qu'un sérum faible ou même presque dépourvu d'activité, car l'expérience prouve qu'après une forte injection de toxine le pouvoir antitoxique du sang diminue pendant quelques jours, puis croît de plus en plus jusqu'à atteindre un maximum qu'il garde pendant quelques jours et s'abaisse ensuite graduellement pour disparaître tout à fait si l'on n'intervient pas pour le maintenir. Le meilleur moment pour pratiquer la saignée paraît être dix ou onze jours après une dernière injection de forte dose.

Wernicke (2) serait parvenu à immuniser des chiens par une méthode toute spéciale, celle de l'alimentation avec de la viande d'animaux diphtériques. D'après Roux, cependant, l'introduction de toxine dans l'intestin ne doit déterminer aucun effet toxique; il semblerait alors que l'immunité dût être indépendante de la toxicité vraie. Un premier chien, jeune, pesant 5 kilogrammes et demi, fut nourri exclusivement avec de la viande d'une brebis immunisée contre la diphtérie; un second, adulte, pesant 35 kilogrammes, avec celle d'une brebis morte de diphtérie chronique. Le premier consomma en six jours une quantité de viande égale à son propre poids; le second ne reçut que le tiers de son poids. Après trois jours, le premier chien et un chien témoin reçurent sous la peau un demi-centimètre cube d'une culture virulente. Le témoin mourut après quatre jours; le premier chien ne présenta qu'un peu d'œdème au point d'inoculation, son état général resta normal; on retrouva cependant, plus de quinze jours après l'inoculation, des Bacilles diphtériques à l'endroit de l'injection. Le second chien succomba à une inoculation de 1 centimètre cube de culture. L'immunité obtenue par la nutrition à la viande de brebis immunisée serait donc plus stable que celle que l'on obtient avec la viande de brebis morte de diphtérie chronique; de plus, la puissance de cette immunité serait en rapport avec la quantité de viande ingérée. En renforçant l'immunité ainsi obtenue à l'aide d'injections à doses graduellement croissantes de toxine ou de cultures virulentes, Wernicke est parvenu à obtenir un sérum dont la force curative est si grande qu'un centimètre cube de ce sérum suffisait à immuniser plusieurs centaines de kilogrammes d'animal. Si

(1) Salomonsen et Madsen, Recherches sur la marche de l'immunisation active contre la diphtérie (*Ann. de l'Inst. Pasteur,* XI, 1897, p. 315 : XIII, 1899, p. 262).
(2) Wernicke, *Loc. cit.*, p. 856.

l'on usait de ce sérum pour l'homme, il suffirait donc de quelques centigrammes pour immuniser un adulte et quelques milligrammes pour un enfant. Les quelques résultats cités sont encore trop peu nombreux pour permettre d'asseoir une opinion.

ESSAI DU SÉRUM ANTIDIPHTÉRIQUE.

Les propriétés bien spéciales d'un sérum antidiphtérique ainsi obtenu sont utilisées pour préserver et combattre la diphtérie chez l'homme, c'est-à-dire préventivement et curativement. Le pouvoir préventif et curatif dépend de la présence dans le sérum de substances, encore bien peu connues, dont les proportions sont certainement en rapport avec les effets qui sont déterminés.

D'après ce que l'on sait de l'action d'un tel sérum, trois indications sont à rechercher. On doit chercher à estimer son *pouvoir préventif*, son *pouvoir curatif*, son *pouvoir antitoxique*.

Il est d'un grand intérêt, par conséquent, de se rendre un compte exact de la puissance d'un sérum pour pouvoir être assuré de son activité thérapeutique et aussi évaluer la quantité à employer dans un cas donné. Plusieurs méthodes peuvent conduire au résultat cherché ; celles qui sont surtout employées sont la méthode du début de Behring-Ehrlich, celle de Roux et celle d'Ehrlich.

Méthode d'essai de Behring-Ehrlich. — Le sérum est mélangé en proportions graduellement croissantes à une dose de toxine représentant dix fois la dose mortelle pour un cobaye adulte de poids moyen, 400 grammes environ. Avec une toxine considérée comme normale, qui tue un tel cobaye en quarante-huit heures à la dose de 1/10e de centimètre cube, on prend 1 centimètre cube de cette toxine en plusieurs éprouvettes, et l'on y ajoute des doses variables, de moins en moins considérables, de sérum, par exemple un millième, neuf dix-millièmes, huit dix-millièmes, sept dix-millièmes, cinq dix-millièmes de centimètre cube, et ainsi de suite, de sérum que l'on a au préalable dilué dans une solution de chlorure de sodium à 8 p. 1000 soigneusement stérilisée d'avance, pour pouvoir évaluer plus aisément la proportion à ajouter. Le mélange est ramené à 3 centimètres cubes par addition de solution physiologique et injecté sous la peau des cobayes que l'on doit prendre d'un poids aussi égal que possible. Les cobayes qui ont reçu des mélanges trop peu riches en sérum, où la toxine n'a été neutralisée qu'en partie, périront après un intervalle de temps variable suivant la quantité de toxine neutralisée, ou présenteront seulement une réaction locale plus ou moins intense; ceux qui auront été inoculés avec un mélange où la toxine est entièrement neutralisée n'offriront aucun symptôme ni général ni local. La quantité de sérum de ce dernier mélange pourra servir de base à l'évaluation de son activité. Ainsi, si dix centièmes de centimètre cube, ou 10 centigrammes, de sérum neutralisent exactement 1 centimètre cube de toxine, dix fois la dose mortelle pour un cobaye, on aura, comme l'admet Behring, un *sérum normal* renfermant une *unité antitoxique* dans un centimètre cube ; 10 centimètres cubes de ce sérum représenteront dix unités antitoxiques. Si un sérum possède une activité telle que 1 milligramme neutralise 1 centimètre cube de toxine, ce sérum sera cent fois plus actif que le sérum dit

normal; il contiendra 1000 unités antitoxiques Behring dans 10 centimètres cubes.

Ehrlich et Wassermann insistent sur le point qu'il faut, pour évaluer exactement un sérum, se baser non pas sur la dose qui préserve le cobaye de la mort, mais sur celle qui neutralise absolument la toxine et empêche la production de toute réaction locale, de tout œdème au point d'inoculation (1).

La grosse objection à faire à cette manière d'opérer est dans l'imprécision complète de la dose de toxine que l'on emploie, la quantité de 1/10e de centimètre cube, prise comme base, pouvant en effet être justement suffisante, ou largement suffisante, ou très largement suffisante, pour déterminer la mort du cobaye dans le temps voulu ; il peut y avoir excès ou grand excès de toxine à neutraliser, ce qui rend l'estimation fautive.

Méthode d'essai de Roux. — La méthode d'essai imaginée par Roux donne des renseignements soit sur le pouvoir préventif, soit sur le pouvoir curatif du sérum, suivant que l'on fait intervenir ce dernier avant ou après l'introduction dans l'organisme du Bacille diphtérique ou de sa toxine.

Pouvoir préventif. — Pour évaluer à ce point de vue l'activité d'un sérum, Roux prend comme base la quantité, par rapport au poids du cobaye, qui en est nécessaire pour préserver tout à fait de la mort ce cobaye auquel on fait, douze heures après l'injection sous-cutanée du sérum, une injection sous-cutanée de culture virulente de diphtérie âgée de vingt-quatre heures, ou d'une dose de toxine capable de tuer en quarante heures un cobaye de 500 grammes. Si cette quantité est de 1/25 000e, 1/50 000e, 1/100 000e ou plus du poids du cobaye, le sérum est dit *actif au vingt-cinq-millième*, *au cinquante-millième*, *au cent-millième* ou plus.

Pouvoir curatif. — On l'évalue en injectant sous la peau de cobayes un demi-centimètre cube de culture virulente de diphtérie âgée de vingt-quatre heures et, six heures après, des quantités de sérum graduellement décroissantes, égales au 25/1000e, 50/1000e, 100/1000e ou moins du poids du corps. La survie de certains de ces cobayes indique quelle est à peu près la quantité de sérum nécessaire pour empêcher la mort par rapport au poids de l'animal et fixe l'activité du produit. Toutefois, il est nécessaire de ne pas trop retarder l'injection du sérum ; la quantité doit en être augmentée à mesure qu'on le fait agir plus tard. Il arrive même un moment, plus ou moins tôt suivant l'activité de la culture ou de la toxine, où l'intoxication est déjà trop établie et trop profonde pour qu'on puisse sauver les animaux, même en usant de doses élevées de sérum.

Roux considère comme suffisamment actif pour être employé au traitement des malades un sérum dont un centième de centimètre cube injecté à un cobaye de 500 grammes le protège contre une inoculation de un demi-centimètre cube de culture diphtérique bien virulente (tuant le cobaye en moins de trente-six heures à cette dose), ou de la dose de toxine indiquée plus haut, faite douze heures après. D'après ce qui vient d'être dit plus haut, on voit qu'un tel sérum est actif au cin-

(1) Ehrlich, Die Werthbemessung des Diphterieheilserums und deren theoretischen Grundlage. Iéna, 1897.

quante-millième ; c'est l'activité minima demandée pour son utilisation thérapeutique.

Il y a des objections et des réserves à faire à cette méthode d'essai qui mérite cependant d'être conservée.

Ceci vise surtout, comme dans la méthode précédente, l'imprécision de la dose de toxine ou de culture virulente que l'on emploie, qui peut être trop forte, même beaucoup trop forte, pour obtenir le résultat pris comme base, la mort du cobaye de 500 grammes en moins de quarante heures.

Ici, il semble préférable de se servir de toxine, puisque la diphtérie est maladie d'intoxication et que c'est la toxine diffusée dans le corps qui produit les troubles que l'on veut combattre par le sérum ; en se servant de toxine, on se rapproche plus certainement de ce qui se passe chez l'homme malade.

Pour être sûr de la dose de toxine qui est à employer, il faudrait prendre non pas une dose approximative, mais une *dose minima* réelle qui serait à déterminer chaque fois, à cause des variations que présentent les différentes toxines, même obtenues dans des conditions identiques, ou que subit une même toxine avec l'âge et les circonstances de conservation ; cette détermination ne peut en outre bien se faire qu'à l'aide d'une série d'essais portant sur un assez grand nombre d'animaux.

De plus, il y a à faire intervenir aussi la sensibilité individuelle des cobayes à la toxine ; certains meurent avec des doses moindres que celles qui laissent vivre les autres. Il est possible d'y remédier en prenant plusieurs cobayes pour chaque essai et faisant une moyenne. Il semble préférable aujourd'hui de prendre des cobayes de 250 à 280 grammes au lieu de cobayes de 500 grammes. La comparaison des résultats avec ceux obtenus par d'autres méthodes, la suivante particulièrement, devient ainsi plus facile.

Enfin, il faut admettre que, pour qu'on puisse affirmer qu'il y a neutralisation absolue de la toxine par le sérum, il ne se produise aucune lésion locale, ni œdème ni escarre, au point d'inoculation du produit virulent, ni lésion générale tardive telle que parésie ou paralysie ; cependant il semble que l'absence de tout épanchement même minime, en ce point soit un fait assez rare.

Méthode d'essai d'Ehrlich. — *Mesure du pouvoir antitoxique du sérum.* — Les méthodes précédentes ont surtout un point faible, la valeur incertaine de la base d'opération qui est la toxine.

Il a paru à Ehrlich qu'en raison de la variabilité des toxines que l'on obtient, même en fixant rigoureusement les conditions d'expérience, et des variations d'une même toxine sous l'influence de l'âge et de la conservation, il n'était pas possible de songer à prendre un type fixe, un étalon de toxine, auquel seraient alors comparés les sérums à essayer.

Par contre, le sérum desséché, conservé à l'abri de l'air et de la lumière, garde pendant longtemps son pouvoir antitoxique intact. Il est donc très facile de le prendre comme étalon.

La méthode d'essai, préconisée par Ehrlich, consiste à prendre comme unité de base une quantité déterminée d'un sérum étalon et de lui comparer, en se servant d'une toxine quelconque, le sérum à essayer.

Il considère comme *unité antitoxique* (*unité d'immunisation*, *unité immunisante*, *Immunitäts-Einheit*, en abrégé *IE*) la quantité de sérum

qui neutralisait exactement *in vitro* 100 doses mortelles d'une toxine qu'il possédait au début, ou immunisait un cobaye contre 100 doses mortelles de cette toxine. Un sérum qui contient une unité antitoxique au centimètre cube est dit *sérum normal*.

Le premier sérum étalon contenait 1700 unités immunisantes dans un gramme de produit sec. Tous les autres sérums étalons ont été repérés sur ce premier sérum.

L'Institut de thérapeutique expérimentale de Francfort (Institut für experimentelle Therapie) conserve le sérum étalon en tubes scellés contenant $2^{gr},5$ de sérum sec. Il titre actuellement 2544 unités au gramme. Tous les deux mois, le contenu d'un tube est dissous, de façon à donner 636 centimètres cubes dans un liquide contenant 2/3 de glycérine et 1/3 de solution de chlorure de sodium à 8,5 pour mille. On obtient ainsi la solution test d'antitoxine, *test-sérum*, contenant 10 IE au centimètre cube. Cette solution se conserve sans altération pendant deux mois; elle est renouvelée après ce laps de temps. L'Institut envoie en tubes scellés des doses de 1 centimètre cube.

Ce sérum étalon sert à déterminer la valeur de la toxine dont on dispose (1).

On a grand avantage, si on a souvent des essais à faire, à se servir de préférence d'une toxine d'activité assez constante, toxine âgée de six à huit mois, d'un an même, qui ne varie plus guère. Les opérations en sont simplifiées, parce que l'on connaît à peu près son degré d'activité.

Tous les essais doivent être faits avec des cobayes du poids de 250 à 280 grammes en inoculation sous-cutanée.

L'activité de cette toxine est déterminée à l'aide du sérum étalon, de façon à établir les valeurs limites (*limes*) suivantes.

Dose limite zéro, L0 : c'est la quantité de toxine qui est exactement neutralisée par une IE. On l'établit en mélangeant des doses croissantes de toxine à une unité antitoxique ; quand il y a neutralisation absolue, l'inoculation ne produit aucun symptôme morbide, ni local, pas d'œdème, ni général, même pas de parésie.

Supposons que ce résultat soit obtenu par le mélange de 2 centimètres cubes de toxine avec une IE. On aura $L0 = 2^{cc},0$. On fait une série de mélanges où la proportion de toxine est graduellement augmentée de $0^{cc},1$; pour chacun d'eux, on laisse quinze minutes à l'abri de la lumière, et l'on injecte sous la peau d'un cobaye de 250 à 280 grammes.

Avec le mélange 1 IE + $2^{cc},1$ toxine, on observe un œdème au point d'inoculation ; avec $2^{cc},2$, l'œdème sera plus prononcé, mais passera vite ; avec $2^{cc},3$ et $2^{cc},4$, la lésion locale est plus forte et subit un processus de nécrose, il y a un début d'intoxication ; avec $2^{cc},5$, une bonne partie des animaux succombent entre quatre et douze jours ; à $2^{cc},6$ tous les cobayes meurent en trois et quatre jours.

Cette dernière dose est la *Dose limite mortelle*, L + ; c'est la quantité de toxine qui, mélangée avec une IE, contient encore en excès, non neutralisée, une proportion de toxine exactement suffisante pour tuer en quatre jours un cobaye de 250 à 280 grammes.

L'obtention de L0 et L + permet de déterminer par différence

(1) Voy. OTTO, Die staatliche Prüfung der Heilsera (*Arbeiten aus d. Königl. Institut für experimentelle Therapie Frankfurt a. M.*, 1906).

L + — L0, la *dose mortelle minima*, *DL*, de la toxine. C'est la plus petite quantité de la toxine qui peut tuer en trois ou quatre jours, en inoculation sous-cutanée, un cobaye de 250 à 280 grammes.

Pour le sérum à essayer, l'unité antitoxique, IE, sera donc la plus petite quantité de sérum qui, *in vitro*, neutralisera complètement 100 DL.

On opère de la façon suivante pour faire une mensuration, les valeurs précédentes étant connues :

On prend 1 centimètre cube de la dilution de sérum étalon obtenue comme il a été dit page 864, renfermant 10 IE : on mélange avec 19 centimètres cubes de solution physiologique. Deux centimètres cubes de ce mélange renferment par conséquent une unité antitoxique.

D'un autre côté, on mélange 2 centimètres cubes de la toxine avec 18 centimètres cubes de solution physiologique.

Supposons que, pour cette toxine, L + soit égale à $2^{cc},6$ comme il a été dit tout à l'heure.

On prépare des mélanges avec de la solution physiologique, contenant chacun dans 4 centimètres cubes la dose L + de toxine et des quantités décroissantes du sérum à essayer, que l'on note exactement. Ces quantités de sérum sont obtenues avec les dilutions suivantes. On veut rechercher, par exemple, si un sérum contient au centimètre cube 100, 200, 300, 400, 500 unités antitoxiques. On prépare cinq flacons, contenant chacun 199, 299, 599, 799, 999 centimètres cubes de solution physiologique. A chacune de ces quantités, on ajoute exactement 1 centimètre cube du sérum à essayer, puis la pipette est bien rincée et le mélange bien opéré. De chacune de ces dilutions, on prélève $2^{cc},6$ qui sont la quantité à ajouter à chaque dose L +. On mélange soigneusement le sérum et les 4 centimètres cubes de la dilution de toxine et de solution physiologique et on laisse un quart d'heure à la température du laboratoire.

Ces mélanges sont alors injectés en entier, avec soin, sous la peau de cobayes de 250 à 280 grammes. Parmi les animaux, les uns ne meurent pas, les autres meurent en moins de quatre jours, un meurt en quatre jours et a reçu par conséquent le mélange renfermant une dose mortelle de toxine libre. Ce dernier mélange contient du sérum dilué à $1/n^e$ de centimètre cube ; puisqu'il produit vis-à-vis de L + la même action qu'une IE du sérum étalon, c'est qu'un centimètre cube du sérum à essayer renferme *n* IE.

Cette unité antitoxique se trouve dans 1 centimètre cube du sérum normal (p. 864). Si elle existe dans $0^{cc},01$ d'un sérum à essayer, ce dernier renferme au centimètre cube 100 IE et titre 1000 IE dans la dose de 10 centimètres cubes; si elle existe dans $0^{cc},005$ du sérum à essayer, ce dernier renferme au centimètre cube 500 IE et titre 5000 IE dans la dose de 10 centimètres cubes, ainsi de suite pour des quantités moindres de sérum et des valeurs plus élevées.

On multiplie d'autant plus les essais qu'on veut serrer le résultat de plus près et obtenir une précision plus grande. En pratique, on peut largement se contenter d'une estimation faite à 5 p. 100 près.

Cependant, il faut reconnaître que les résultats que l'on obtient ne sont pas toujours aussi nets et aussi constants. Il arrive encore souvent que l'on constate des irrégularités dans les séries d'expériences ainsi instituées.

Des cobayes succombent avec des doses de toxine inférieures à celles qui laissent survivre d'autres. Il y a sous ce rapport, chez les animaux, des variations individuelles qui font que la résistance et la sensibilité à la toxine ne peuvent être regardées comme des quantités nettement fixées.

Il y a en plus des toxines qui s'écartent plus ou moins des règles admises. Il se peut, par exemple, que l'on constate que la différence L + – L0 se manifeste comme supérieure à 1 DL. C'est ce qu'Ehrlich désigne sous le nom de *phénomène paradoxal*, et explique en admettant qu'il s'est formé dans le produit des composés secondaires dérivés de la toxine, *toxones ou toxoïdes*, dont l'avidité pour le sérum, plus précisément pour l'antitoxine, est égale à celle de la toxine vraie, mais qui ont une toxicité bien moindre.

La toxine apparaît en tout cas comme un corps extrêmement complexe et variable dont il est toujours délicat d'évaluer exactement les propriétés.

Aussi, on peut penser que toutes ces méthodes ne peuvent donner que des évaluations approximatives. Il n'est guère possible, à leur aide, d'énoncer des données d'une certitude rigoureuse.

Jusqu'ici, le meilleur signe de la valeur d'un sérum se trouve encore dans la constatation des résultats cliniques obtenus (1).

Les chevaux dont l'immunisation a été conduite comme il a été indiqué pages 857 et 858 fournissent, lorsqu'on les saigne onze à douze jours après la dernière injection de toxine, un sérum dont l'activité est d'ordinaire au moins égale, souvent supérieure, au cinquante-millième d'après la méthode de Roux, et contient environ 300 IE d'après celle d'Ehrlich. En augmentant les dernières doses de toxine ou en employant des toxines très fortes, il est possible d'obtenir des sérums d'activité plus grande, actifs au quatre-vingt-millième, au cent-millième. Il ne paraît pas utile de dépasser cette puissance. D'ailleurs, les conditions individuelles de l'animal interviennent ici, sans que l'on puisse en donner une raison bien précise ; parmi plusieurs chevaux soumis à une méthode d'immunisation identique en tous points, il en est qui fournissent un sérum plus actif que celui fourni par d'autres. Il est possible de mélanger ces divers sérums et d'obtenir un produit d'activité moyenne.

Nous savons que chez un animal immunisé le degré d'immunisation qui a atteint son maximum à un moment donné, ou la puissance antitoxique de son sang, ce qui ne peut se séparer, ne reste pas longtemps stable, n'est pas une qualité acquise définitivement, mais diminue progressivement à mesure qu'on s'éloigne du moment de la dernière injection de toxine, et peut même disparaître complètement après un certain temps. Si l'on veut que l'animal en question fournisse périodiquement du sérum antitoxique, il est nécessaire d'entretenir son immunisation. On y parvient facilement en lui injectant régulièrement, dans l'intervalle de deux saignées, une dose suffisante de toxine.

On peut, après avoir laissé reposer plus ou moins l'animal, pendant dix ou quinze jours par exemple, lui faire une série d'injections sous-cutanées de toxine à doses modérées et croissantes ; ou même, mais

(1) Cruveilhier, De la valeur thérapeutique de l'antitoxine dans le sérum antidiphtérique (*Ann. de l'Inst. Pasteur*, XIX, 1905, p. 249).

ce qui est moins à conseiller, pendant que la canule qui a servi à la saignée est encore en place, lui faire une injection massive, 300 à 500 centimètres cubes de toxine. Les expériences de Roux et Vaillard sur l'immunisation contre le tétanos ont démontré qu'on obtient toujours un sérum plus actif en multipliant les injections de doses relativement petites de toxine; de plus, les injections sous-cutanées semblent fournir un sérum plus actif que les injections intraveineuses, les massives surtout; le premier procédé est donc à préférer (1). On peut recommencer le traitement d'immunisation huit à quinze jours après une saignée et le conduire de la façon suivante :

8e jour	après la	saignée :	Injection de	50cc	de toxine.
10e	—	—	—	50cc	—
12e	—	—	—	50cc	—
14e	—	—	—	50cc	—
15e	—	—	—	100cc	—
16e	—	—	—	100cc	—
17e	—	—	—	100cc	—
18e	—	—	—	100cc	—
19e	—	—	—	120cc	—
20e	—	—	—	150cc	—

De telles doses concernent l'emploi d'une toxine de bonne activité, tuant le cobaye en vingt à quarante heures à la dose de 1/100e de centimètre cube ; avec des toxines plus fortes, les doses sont à diminuer en proportion. On doit se guider toujours sur la réaction produite, éviter une réaction trop forte, éviter surtout une trop grande élévation de température, des températures supérieures à 39° paraissant nuire à une bonne formation d'antitoxine.

La saignée suivante est faite onze à douze jours après la dernière injection.

On peut répéter la saignée un grand nombre de fois sur un même cheval, tantôt du même côté, tantôt en alternant. Les chevaux en traitement actuellement dans les divers Instituts paraissent pouvoir très bien supporter le traitement et servir ainsi pendant des années à l'obtention du sérum. On a déjà remarqué cependant que l'emploi de toxines très actives, comme celles obtenues par exaltation de la virulence d'un Bacille, toxines qui tuent le cobaye à doses dix ou vingt fois moindres que la toxine normale de Roux, détermine parfois des symptômes de dénutrition et de cachexie chez certains chevaux.

La façon dont les chevaux supportent les injections de toxine diphtérique est des plus variable. Il en est qui présentent des réactions notables avec de faibles doses de toxine, 1 centimètre cube ou moins : leur température s'élève au-dessus de 40°, l'œdème peut être énorme. D'autres ne présentent pour ainsi dire aucune réaction à des doses plus fortes. Certains fournissent, avant toute inoculation, un sérum déjà légèrement antitoxique pour le cobaye; on pourra les choisir de préférence ; ils supportent mieux les injections de toxine et peuvent arriver plus vite aux hautes doses. Si l'on vient, dans le cours des opérations, à changer le microbe producteur de toxine, on pourra observer des

(1) Nidrigailoff et Ostrianine, Ueber die Immunisation gegen das Diphterietoxine (*Centralbl. für Bakt.*, 1re Abth., Orig., XLV, 1907, p. 558).

changements dans les symptômes habituels. L'observation suivie des sujets guidera l'opérateur dans les modifications à apporter au procédé.

Le sérum recueilli aseptiquement par la méthode Pasteur peut se conserver indéfiniment sans présenter d'autre modification qu'une légère précipitation de fibrine qui se produit à la longue sous forme de flocons, de très fins grumeaux ou même de fins cristaux. Lorsqu'on ne recueille pas de sang d'une façon absolument aseptique, il faut laisser la coagulation et la séparation du sérum se faire à 0° et ajouter au sérum soutiré des substances antiseptiques, de l'acide phénique par exemple, en proportion de 0,5 p. 100 comme on le fait en Allemagne, ou le filtrer sur bougie Chamberland; cette dernière méthode lui enlève toujours de son activité (1), la bougie de porcelaine retenant de la substance antitoxique. Il est beaucoup préférable de recourir à la méthode de Pasteur. Elle a été décrite précédemment avec détails (p. 234 et suiv.).

Le sérum soutiré aseptiquement d'une façon ou d'une autre, et ici la simple pipette Chamberland est d'un excellent usage, est réparti dans des flacons de conserve ou dans les tubes qui serviront directement au praticien. Les flacons de conserve peuvent être des ballons stérilisés dont le col est étiré après un remplissage ou qui sont simplement bouchés avec un bon bouchon de caoutchouc stérilisé à l'autoclave dans une enveloppe de papier brouillard. Les tubes à utiliser ont une contenance de 10 centimètres cubes et sont simplement bouchés avec un bouchon de caoutchouc stérilisé qu'on recouvre d'une couche de paraffine fondue ou d'un capuchon de caoutchouc stérilisé.

Dans des flacons bien remplis, conservés à l'obscurité, le sérum garde longtemps sa puissance antitoxique. De nombreuses expériences démontrent qu'il peut rester un an et plus sans s'affaiblir, ou en ne s'affaiblissant que d'une manière insignifiante.

Certains agents physiques ou chimiques ont sur son activité une influence manifeste (2). La lumière du jour a une action affaiblissante manifeste, quoique lente; après trois ou quatre mois, le pouvoir antitoxique est très diminué; ce sont surtout les rayons bleus qui agissent, les rayons jaunes et rouges sont très peu actifs. Des températures moyennes, maintenues pendant peu de temps, sont sans effets appréciables sur l'activité du sérum; on peut le maintenir pendant plusieurs jours à l'étuve à 38° sans le voir s'affaiblir; c'est même là un excellent moyen pour s'assurer de sa pureté microbienne. D'après Marenghi (3), on peut le chauffer à 55° pendant cinq heures sans le voir rien perdre de son activité. En chauffant pendant vingt minutes à 59°-59°,5, l'affaiblissement est réel, mais très minime; à partir de 60°, 65°, 70°, tout pouvoir se perd rapidement, complètement en moins d'une heure. Le sérum desséché à basse température, puis à 100° dans un courant d'air sec, peut supporter un chauffage d'une demi-heure à 110° ou d'un quart d'heure à 140°

(1) Dzierzgowski, Sur la filtration des substances albuminoïdes à propriétés actives (*Arch. des sc. biol. de Saint-Pétersbourg*, IV, 1895, p. 225).

(2) Muller, Ueber die Resistenz des Diphterieheilserum gegenüber verschiedenen physikalischen und chemischen Einflüssen (*Centralbl für Bakt.*, XXIV, 1898, p. 251 et 316).

(3) Marenghi, Ueber die gegenwärtige Wirkung der antidiphteritischen Serums und Diphterietoxins (*Centralbl. für Bakt.*, 1897, XXII, p. 520).

sans perdre ses propriétés (1). Une température de 37° a une action affaiblissante déjà marquée après un mois; le froid modéré conserve bien. L'oxygène est un atténuateur énergique; l'air agit dans le même sens, mais plus lentement. L'azote et l'acide carbonique donnent les mêmes résultats que l'air. L'addition d'acides ou de bases détruit toute activité; de même l'action digestive exercée par la pepsine ou la trypsine.

L'addition de petites quantités d'antiseptiques ne paraît pas nuire. Elle est réglementaire dans certains pays; en Allemagne particulièrement, on additionne le sérum de 0,5 pour 1000 d'acide phénique. Cette addition vise surtout le danger de la présence du *Bacille de la morve*, lequel, d'après Bonhoff (2), est tué en vingt-quatre heures avec cette dose d'antiseptique. La malléinisation pratiquée avec soin permet d'écarter toute crainte.

La filtration sur bougie Chamberland produit une stérilisation parfaite, mais retient souvent beaucoup d'antitoxine.

Desséché dans le vide, avec soin, le sérum retrouve ses propriétés préventives quand on le dissout à nouveau dans huit ou dix fois son poids d'eau. Cette particularité peut servir pour des transports lointains. Cette solution donne au point d'inoculation une petite tuméfaction passagère que ne produit pas le sérum naturel. Des sérums secs renferment jusqu'à 5000 et 6000 IE au gramme. Il est possible d'obtenir, par une concentration plus ou moins poussée, des sérums à activité plus grande.

Contrôle du sérum. — En France, la préparation et la vente du sérum antidiphtérique sont réglementées par la loi du 25 avril 1895, qui impose l'obtention d'une autorisation gouvernementale donnée après avis du Conseil supérieur d'hygiène. Le sérum qui date de plus d'un an ne peut être mis en vente; la mention de la date de la saignée est obligatoire sur chaque flacon.

Le Congrès de Bruxelles de 1903 s'est occupé des moyens de titrage et de contrôle des sérums; les conclusions formulées ne peuvent pas être considérées comme définitives, la question restant encore à l'étude.

En Allemagne, la loi a institué un contrôle officiel qui se fait à l'Institut de thérapeutique expérimentale de Francfort. Le pouvoir antitoxique du sérum est déterminé par la méthode d'Ehrlich et le produit rejeté ou classé dans différentes catégories d'après sa teneur en unités immunisantes, pouvant contenir de 200 à 3000 IE par flacon de 10 centimètres cubes. La mention de la date de la saignée et l'indication de la teneur en unités immunisantes sont imposées sur chaque flacon.

Le sérum doit être stérile; on s'en assure en faisant des cultures aérobies et anaérobies.

Il ne doit pas renfermer plus de 0,5 pour 100 d'acide phénique. Pour s'en assurer on injecte à une souris de 15 grammes un demi-centimètre cube de sérum : si la souris meurt, c'est que la quantité d'acide phénique est supérieure à celle qui est prescrite.

Antitoxine diphtérique. — La substance antitoxique, cette *antitoxine*

(1) Camus, Résistance aux températures élevées des vaccins desséchés (sérum antivenimeux et sérum antidiphtérique) (*Soc. de Biol.*, 26 février 1898).

(2) Bonhoff, Versuche über die Möglichkeit der Uebertragung des Rotzkontagium mittelst Diphtericheilserums (*Berlin. klin. Wochenschr.*, 1897, n° 5).

diphtérique que contient le sérum, est encore bien peu connue. Guérin et Macé (1) l'ont obtenue en traitant par le sérum douze fois son volume d'alcool à 95° ; le coagulum albumineux est lavé sur le filtre à l'alcool, desséché dans le vide au-dessus d'acide sulfurique, réduit en poudre et traité par l'eau distillée. La solution obtenue montre un pouvoir antitoxique très marqué. La substance active paraît être de la nature des diastases. Ce qui confirme encore cette opinion, c'est l'action très marquée de la température ; soumise à une chaleur de 60° à 65°, elle perd rapidement son activité.

Brieger et Boer (2), d'Astros et Rietsch (3) ont réussi à précipiter incomplètement l'antitoxine du sérum en ajoutant 20 p. 100 de chlorure de sodium et autant de chlorure de potassium au sérum dilué dans son volume d'eau.

D'après Belfanti et Carbone (4), l'antitoxine est intimement liée à l'existence de la globuline du sérum ; elle en serait peut-être même une modification.

Smirnow (5), dans plusieurs mémoires, dit avoir obtenu, par électrolyse de toxine diphtérique active, une production d'antitoxine. D'après lui, le meilleur résultat s'obtient en employant un courant faible maintenu pendant longtemps, 80 milliampères pendant seize et dix-huit heures ; les propriétés curatives diminuent en prolongeant l'action. Cette antitoxine, obtenue par électrolyse, n'est douée que d'un pouvoir neutralisant très faible vis-à-vis de la toxine ; malgré cela, elle ne céderait en rien, comme effet thérapeutique, au sérum antidiphtérique.

Marmier (6), qui a repris les expériences de Smirnow, n'a observé dans le produit aucune action immunisante ou curative ; il a vu la toxine ainsi traitée perdre tout à fait son activité et se transformer en une véritable solution d'hypochlorites formés sans doute par l'action de l'électrolyse sur les chlorures du milieu ; ce sont peut-être ces derniers sels qui auraient un certain effet curateur, comme le démontrent des expériences de L. Martin. Il dit également n'avoir obtenu aucun résultat en usant des courants alternatifs à haute fréquence.

Ehrlich et Wassermann (7), ayant observé la présence d'antitoxine dans le *lait* des animaux immunisés, proposèrent de se servir de ce liquide comme source de ce produit. On comprend l'intérêt et l'importance que pourrait présenter cette méthode, s'il devenait facile d'extraire du lait l'antitoxine pure ou suffisamment purifiée. En outre, il

(1) Guérin et Macé, Sur l'antitoxine diphtérique (*C. R. de l'Acad. des sc.*, 5 août 1895).

(2) Brieger et Boer, Ueber Antitoxine und Toxine (*Zeitschr. für Hygiene*, XXI., 1896, p. 249).

(3) D'Astros et Rietsch. Essais d'extraction de l'antitoxine diphtérique (*Soc. de biol.*, 31 mars 1900).

(4) Belfanti et Carbone, Contributo alla conescenza dell'antitoxina diphterica (*Arch. per le Scienza med.*, XXIX, 1898).

(5) Smirnow, Ueber die Behandlung der Diphterie mit Antitoxinen, die ohne Vermittelung des thierischen Organismus darstelbar sind (*Berlin. klin. Wochenschr.*, 1894, p. 683). — Id., Ueber die Behandlung der Diphterie mit künstlich dargestelten Antitoxinen (*Berlin. klin. Wochenschr.*, 1895, p. 645 et 675). — Id., Note sur la détermination du pouvoir neutralisant du sérum antidiphtérique (*Arch. des sc. biol. de Saint-Pétersbourg*, IV, 1895, p. 328).

(6) Marmier, Les toxines et l'électricité (*Ann. de l'Inst. Pasteur*, X, 1896, p. 469).

(7) Ehrlich et Wassermann, Ueber die Gewinnung der Diphterie-Antitoxine aus Blutserum und Milch immunisierte Thiere (*Zeitschr. für Hygiene*, XVIII, 1894, p. 239).

est beaucoup plus facile avec le lait de suivre chez l'animal, pour ainsi dire jour par jour, la formation de la substance antitoxique et les variations qu'elle peut présenter.

La quantité d'antitoxine que peut contenir le lait d'une chèvre ou d'une vache immunisées, varie naturellement avec le degré d'immunisation auquel on est parvenu. On l'apprécie facilement en évaluant, comme pour le sérum, la quantité de toxine active qu'un volume donné de lait peut neutraliser. Au début de l'immunisation, 5 centimètres cubes de lait ne suffisent pas pour neutraliser 1 centimètre cube de toxine; plus tard, il ne faut plus pour cette dose de toxine qu'un dixième de centimètre cube environ. Le lait est alors actif au cinquantième. Le rapport entre la valeur antitoxique du sang et du lait d'un même animal bien immunisé serait comme 1 est à 20, d'après les auteurs cités. Une chèvre produisant en moyenne 30 litres de lait par mois peut ainsi fournir une quantité d'antitoxine égale à celle contenue dans un litre et demi de sang, dose à laquelle on ne pourrait pas arriver sans danger. Une vache donnant journellement une dizaine de litres de lait en fournirait une quantité beaucoup plus grande.

L'important serait d'arriver à extraire cette antitoxine sinon pure, du moins sous une forme utilisable. Wassermann (1) indique le procédé suivant : le lait est recueilli, avec toutes les précautions antiseptiques, dans des vases stérilisés; on y ajoute 20 centimètres cubes de solution normale de chlorure de sodium par litre et une quantité de présure suffisante pour obtenir une coagulation complète et rapide. On décante le liquide clair qui s'est séparé du coagulum et on l'agite quelque temps, dans de grands vases à précipités, avec du chloroforme pour le débarrasser de la graisse. Par le repos, le chloroforme se réunit au fond du vase. En décantant, on obtient un liquide clair, dépourvu de Bactéries, qui peut se conserver pendant des mois sans perdre son activité, ou servir aux préparations ultérieures.

D'après l'activité antitoxique de ce dernier liquide, on le traite par le sulfate d'ammoniaque en proportion de 30 à 33 p. 100. Il se produit un précipité qui est recueilli sur filtre et rapidement détaché sur une spatule de platine, placé sur une plaque de porcelaine dégourdie, desséché dans le vide, exprimé pour le débarrasser du sulfate d'ammoniaque en excès et redissous ensuite dans une quantité d'eau dix fois moindre que la quantité du liquide obtenu après coagulation du lait. Il reste dans la solution une faible quantité de sulfate d'ammoniaque qui ne présente aucun inconvénient pour son emploi chez l'enfant.

Pour employer avec avantage ce procédé, on a intérêt à pousser l'immunisation de l'animal à un très haut degré; la proportion d'antitoxine contenue dans le lait est plus grande: elle est loin cependant d'atteindre celle qui se trouve dans le sérum.

L'antitoxine diphtérique, ou le sérum qui en contient, donne très rapidement, sur-le-champ pour ainsi dire, l'immunité aux animaux. Cette immunité, toutefois, ne dure pas; elle diminue vite pour disparaître au bout de quelques jours ou quelques semaines, selon la propor-

(1) Wassermann, Ueber Concentrirung der Diphterie-Antitoxine aus der Milch immunisierte Thiere (*Zeitschr. für Hygiene*, XVIII, 1894, p. 235).

tion d'antitoxine introduite. Elle diffère notablement sous ce rapport de l'immunité obtenue par injections progressives de toxine, qui est beaucoup plus durable.

Les idées que l'on peut se faire de l'action de l'antitoxine sur la toxine ont été exposées précédemment (p. 143).

Dans l'application du sérum antitoxique au traitement de la diphtérie humaine, la question de la dose à injecter a une grande importance. Elle doit varier suivant la puissance du sérum, l'âge du sujet, la gravité et la période de la maladie (1).

Il existe trois numéros de sérum Behring : le n° I contient 600 unités IE dans 10 centimètres cubes; le n° II, 1 000 unités; le n° III, 1 500 unités; le n° IV, 2 000; le n° V, 3 000.

Le sérum Roux a en moyenne une activité comprise entre 1/70 000e et 1/100 000e.

Lorsqu'il s'agit de jeunes enfants et que le traitement est appliqué au début, on peut commencer par une injection de 10 centimètres cubes de sérum Roux ou de sérum Behring n° I; au-dessous d'un an, cette dose peut être réduite à 5 centimètres cubes.

Dans les cas graves, il y a avantage à donner d'emblée 20 centimètres cubes de sérum Roux ou 10 centimètres cubes de sérum Behring n° III.

Chez l'adulte, la dose initiale doit être au moins de 20 centimètres cubes et mieux 30 centimètres cubes.

L'intervention a d'autant plus de chances de succès qu'elle est plus précoce. Le tableau suivant, dû à Samguine (de Moscou), le prouve avec toute évidence :

			MORTALITÉ.
Injection faite le	2e	jour	10,5 p. 100
—	3e	—	13,3 —
—	4e	—	16,8 —
—	5e	—	33 à 40 p. 100

L'état du malade, les symptômes que l'on peut constater, surtout l'étendue des fausses membranes, l'intensité des phénomènes laryngés, serviront de base pour les injections ultérieures. Suivant ce qui se passe, on peut faire une seconde injection de douze à vingt-quatre heures, parfois même six heures, après la première, et continuer plusieurs fois s'il le faut.

D'ordinaire le sérum est très bien supporté. On observe cependant assez souvent la production d'accidents sériques qui paraissent en rapport avec des susceptibilités particulières. Il n'est pas prouvé toutefois que tous les accidents graves observés, l'anurie en particulier, doivent être mis sur le compte du sérum; ils peuvent provenir de l'intoxication diphtérique. A la suite du traitement sérothérapique, on peut observer de la fièvre, de l'érythème, localisé ou généralisé, de l'urticaire, de l'œdème surtout au visage, parfois des arthropathies, qui paraissent bien être sous la dépendance du sérum. Ces accidents se produisent plus facilement ou plus intenses chez les individus qui ont déjà reçu antérieurement, longtemps avant même, des injections de sérum ; on

(1) Haushalter, De l'application des sérums au traitement de la diphtérie et du tétanos (*Congrès de méd. de Nancy*, 1896).

peut voir là un fait d'anaphylaxie (1). D'après Spronck (2), le chauffage préalable du sérum à 59°-59°,5, pendant vingt minutes, est très favorable contre les accidents post-sérothérapiques, surtout les éruptions cutanées, souvent si désagréables ; mais une telle température est déjà nettement affaiblissante et ne paraît du reste pas plus mettre à l'abri des accidents.

Pour Nicolle (3), le sérum antidiphtérique n'a pas d'action nuisible sur le rein sain ; tout au plus détermine-t-il une très légère albuminurie passagère. Les symptômes graves de néphrite sont dus au poison diphtérique que forme l'organisme. Cependant il semble bien qu'on doive admettre que la très légère toxicité d'un sérum, même normal, puisse agir défavorablement sur le rein et être réellement la goutte d'eau qui fait déborder le vase. Spronck (4) admet aussi l'action favorable du sérum dans l'albuminurie diphtérique.

Après l'injection de sérum, on peut observer, au bout de quelques heures, une amélioration notable de l'état général, surtout saisissable dans les cas graves. L'action produite sur les fausses membranes est particulièrement remarquable. Dix à douze heures après l'injection, les fausses membranes deviennent plus blanches, perdent de leur consistance et de leur épaisseur, se décollent d'elles-mêmes de la muqueuse, peuvent se dissocier; à leur place il ne se reproduit qu'un mince enduit disparaissant bientôt à son tour. Souvent, de trente-six à quarante-huit heures, toute trace de fausse membrane a disparu. Dans les formes graves, le processus est plus tenace, les fausses membranes peuvent se reproduire pendant quatre ou cinq jours.

Le résultat indéniable du traitement sérothérapique de la diphtérie est un abaissement notable de la mortalité. Les statistiques démontrent que de 45, 50 et même 60 p. 100, elle peut tomber à 10 ou 15 p. 100, même au dessous. Le moment de l'injection, la quantité de sérum injectée ont une grande importance pour le résultat (5).

Le sérum antidiphtérique n'agit que sur le Bacille de Loeffler et sur sa toxine; aussi les associations microbiennes qui peuvent se rencontrer dans la diphtérie jouent-elles un grand rôle dans l'issue du traitement, ce qui montre de suite l'importance d'un diagnostic bactériologique exact.

On a vu précédemment que le sérum antidiphtérique présentait un pouvoir immunisant manifeste et qu'en l'injectant à la dose suffisante aux animaux d'expérience, cobayes et lapins par exemple, il était possible de leur faire supporter, sans autres symptômes qu'une petite lésion locale, l'injection d'une dose sûrement mortelle de culture virulente de diphtérie. Ce qui démontre qu'il jouit d'un pouvoir préventif

(1) Voy. Pirquet et Schick, Die Serumkrankheit, 1905.

(2) Spronck, Influence favorable du chauffage sur les accidents post-sérothérapiques (*Ann. de l'Inst. Pasteur*, XII, 1898, p. 696).

(3) Nicolle, Action du sérum antidiphtérique sur les reins sains ou malades (*Revue de méd.*, janvier 1898).

(4) Spronck, Étude expérimentale de l'action du sérum antidiphtérique dans l'albuminurie diphtérique préexistante (*Sem. méd.*, 1897, n° 55, p. 434).

(5) Bayeux, La diphtérie avant et depuis l'année 1894, avec les résultats statistiques de la sérumthérapie sur deux cent trente mille cas. Thèse de Paris, 1899.

certain à l'égard de l'affection. Mais il faut se souvenir que l'immunité ainsi produite n'est que de courte durée.

Les applications faites chez l'homme dans un but *préventif* semblent en effet confirmer en tous points les résultats expérimentaux. Pour ne citer que les principales séries, Roux n'a pas vu se produire un seul cas de diphtérie chez 128 personnes en contact permanent avec des diphtériques et injectées préventivement ; Peck a obtenu le même résultat à New-York chez 500 enfants inoculés préventivement pendant une épidémie de diphtérie. Behring et Ehrlich n'ont observé qu'un petit nombre de cas de diphtérie, 10 sur 10 000 inoculés préventivement; chez ceux qui prirent la maladie, l'évolution en fut bénigne ; ils attribuent la production de ces cas à l'emploi d'une quantité trop minime de sérum.

Behring et Erhlich avaient au début indiqué comme dose préventive suffisante le dixième de la dose thérapeutique, 60 unités ; Behring (1) a élevé la dose à 150 unités, de 1 centimètre cube à 1 centimètre cube et demi de son sérum fort. Roux donne comme dose préventive moyenne 5 centimètres cubes de son sérum.

La durée de l'action immunisante suffisante ne paraît pas très constante ; elle varie entre trois et dix semaines; il semble que l'on ne doive guère compter sur plus d'un mois. Il est du reste possible de renouveler l'inoculation préventive. Elle est certainement à conseiller lorsqu'il y a impossibilité absolue d'éloigner des enfants d'un foyer de diphtérie ou d'isoler un malade, ou en cas d'épidémie grave et assez étendue (2).

Enfin on doit reconnaître, d'après des expériences d'Abel, de Wassermann et de Calmette (3), que le sérum de beaucoup d'hommes sains, adultes, jouit d'un certain pouvoir immunisant pour les cobayes, vis-à-vis du Bacille de Loeffler. Ces individus avaient-ils eu la diphtérie, et la propriété de leur sérum n'était-elle que la continuation d'un état antérieur ou était-ce une propriété naturelle, non acquise ? C'est ce que des recherches plus étendues pourront seules démontrer. Le fait qui paraît acquis cependant est la constatation, dans certains cas, de la puissance immunisante du sérum d'hommes sains à l'égard du virus diphtérique.

HABITAT ET RÔLE ÉTIOLOGIQUE

Le *Bacille de la diphtérie* se trouve dans les fausses membranes de la diphtérie vraie de l'homme, tantôt seul, souvent associé à d'autres microbes dont nous nous occuperons plus loin ; sur les muqueuses du pharynx, du larynx, des fosses nasales dans les cas de diphtérie sans fausses membranes, à la surface de plaies contaminées. On l'a signalé également dans l'estomac, dans l'intestin et dans les fèces (4). Il se rencontre peut-être dans certaines diphtéries des animaux ; ces affections paraissent cependant d'ordinaire dues à d'autres microbes qui seront décrits plus loin.

Dans la diphtérie ordinaire, il peut disparaître de la bouche ou du

(1) Behring, Zur Diphterie-Immunisierungs Frage (*Deutsche med. Wochenschr.*, 1894, n° 46).

(2) Weill, De la valeur préventive du sérum antidiphtérique. Thèse de Paris, 1897.

(3) Calmette, Contribution à l'étude des venins, des toxines et des sérums antitoxiques (*Ibid.*, IX, 1895, p. 225).

(4) Schoedel, *Münch. med. Wochenschr.*, 26 juin 1900.

nez en même temps que les fausses membranes, y persister quelques jours ou même y rester assez longtemps à l'état virulent, plusieurs semaines ou même plusieurs mois, quelquefois plusieurs années d'après certaines observations (1). Ce qui montre que les convalescents de diphtérie et même des individus tout à fait guéris, sains en apparence, peuvent être une source de contage.

Loeffler, Roux et Yersin ont établi que le *Bacille de la diphtérie* ne pullule pas dans les organes et ne se retrouve qu'au point d'inoculation dans la diphtérie expérimentale. Frosch (2), Kolisko et Paltauf (3), Barbier et Ulmann (4), Cocurat (5), entre autres, ne le trouvent pas seulement au niveau des lésions pseudo-membraneuses, mais encore dans le sang et dans les organes internes. Les expériences de Cuoghi Constantini (6) et de Métin (7) expliquent ces divergences et montrent que le *Bacille de Loeffler* ne pullule pas dans les organes lorsqu'il a été introduit seul dans l'organisme, dans le cas de diphtérie pure, et que, pour qu'on le retrouve dans le sang ou dans les organes, il faut, d'une part, ne faire l'autopsie que tardivement après la mort, et, d'autre part, qu'il soit associé à d'autres microbes, le *Streptocoque* et le *Staphylocoque doré* surtout. C'est dans ce cas qu'il se produit la forme d'infection qu'on peut désigner sous le nom de *septicémie diphtérique*. On peut le reconnaître par l'ensemencement du sang.

Les recherches de Roux et Yersin, de Kober (8) démontrent la présence du *Bacille de la diphtérie* sur la muqueuse buccale d'individus sains; la proportion en est très variable, de 1 à 5, parfois même 10 p. 100. Chez les personnes en contact avec les diphtériques, la proportion est plus élevée. Toutefois, depuis longtemps Gaffky avait signalé l'absence constante de ce microbe chez l'homme dans les régions indemnes de diphtérie; le fait a été absolument confirmé depuis. La virulence des Bacilles diphtériques ainsi rencontrés est très variable. Elle est souvent faible ou nulle; elle peut, au contraire, être très marquée; la proportion des diverses catégories est inconstante, serait de 10 à 20 p. 100, même plus. Les personnes en contact immédiat avec les malades donnent souvent une proportion plus forte. Ces *porteurs de germes* (9) peuvent puissamment servir à la dissémination de la maladie, tout en restant indemnes. La persistance du Bacille chez eux est des plus variable; elle est souvent très courte, le Bacille disparaissant après

(1) Ulmann et Oppenheim, Persistance du Bacille de Loeffler dans la gorge des sujets atteints de diphtérie (*Presse méd.*, 31 août 1898). — Gregorieff, Le Bacille diphtérique (*Arch. de méd. des enfants*, août 1898).

(2) Frosch, Die Verbreitung des Diphteriebacillus im Körper des Menschen (*Zeitschr. für Hygiene*, XIII. 1893, p. 49).

(3) Kolisko et Paltauf, Zum Wesen des Croups und der Diphterie (*Wiener klin. Wochenschr.*, 1889, n° 8).

(4) Barbier et Ulmann, La diphtérie, 1899.

(5) Cocurat, De la présence du Bacille diphtérique dans les organes. Thèse de Paris, 1898.

(6) Cuoghi Constantini, *Policlinico*, 1er juin 1898.

(7) Métin, Le Bacille de la diphtérie pullule-t-il dans les organes? (*Ann. de l'Inst. Pasteur*, XII, 1898, p. 596).

(8) Kober, Die Verbreitung des Diphteriebacillus auf der Mundschleimhaut gesunder Menschen (*Zeitschr. für Hygiene*, XXXI, 1899, p. 433).

(9) Sacquépée, Les porteurs de germes (Bacilles diphtériques) (*Bull. de l'Inst. Pasteur*, VIII, 1910, p. 689).

quelques jours; mais elle peut être longue, durer plusieurs mois, même plusieurs années.

D'après Creignou (1), ce microbe se rencontrerait, dans plus de la moitié des cas, dans les voies digestives supérieures d'animaux sains et dans le mucus nasal des volailles dans les trois quarts des cas. De tels Bacilles ont alors une virulence très variable, ordinairement faible ou même nulle. Ces assertions demandent confirmation. Brandt (2) en a rencontrés dans la gorge d'un chien, qui avait dû le propager dans une famille.

On a peu de données sur la présence de ce microbe dans le milieu extérieur. Park (3) l'aurait isolé d'une eau de toilette d'un diphtérique; Abel (4) l'aurait trouvé sur des jouets ayant servi à un enfant malade de diphtérie; Wright et Emerson (5) disent en avoir rencontré de bien virulents dans la poussière d'un pavillon de diphtériques, sur les cheveux d'une infirmière, sur les vêtements de personnes approchant des malades. Seiler et Stoutz (6) l'auraient rencontré dans une eau potable, ayant conservé sa virulence.

Les Bacilles que renferment les fausses membranes et les produits pathologiques peuvent en effet garder longtemps leur vitalité et une virulence plus ou moins grande, tout comme nous l'avons vu pour les Bacilles des cultures. Roux et Yersin ont obtenu des cultures typiques, après dix-huit mois, de fausses membranes desséchées et conservées à l'obscurité. Nous avons vu qu'en tubes clos, à l'abri de l'air et de la lumière, les cultures conservaient pendant longtemps leur virulence intacte: il doit en être de même des produits pathologiques lorsque ces conditions sont réunies. Et elles peuvent facilement l'être en réalité dans la nature; on peut, en effet, s'imaginer des linges chargés de fausses membranes ou de crachats diphtériques, enfermés et serrés dans un espace très restreint, et l'on obtiendra à peu près le milieu voulu. C'est là bien certainement, par les linges, chiffons, papiers, un des modes de transmission très admissibles de l'affection. On a cité des cas de diphtérie dus au contact d'objets conservés depuis deux ans.

Lorsque ces conditions changent, que les Bacilles sont exposés à l'air libre, à la dessiccation en présence d'air en abondance, à des alternatives de sécheresse ou d'humidité, à plus forte raison à l'action des rayons solaires, les résultats sont tout à fait différents; la vitalité et la virulence disparaissent assez vite.

L'action de la lumière est surtout remarquable; Roux et Yersin ont observé que dans une fausse membrane exposée à l'air et au soleil les Bacilles étaient complètement tués après deux mois, alors qu'à l'abri de l'air et de la lumière on en rencontrait de vivants pendant un temps beaucoup plus long. Ledoux-Lebard (7) a remarqué que, tandis que la

(1) Creignou, Le Bacille de Loeffler chez les animaux sains. Thèse de Bordeaux, 1898.

(2) Brandt, *Journal of American Association*, 1908, n° 15.

(3) Park, *New York Med. Record*, 1892.

(4) Abel, Beitrag zur Frage von der Lebensdauer der Diphteriebacillen (*Centralbl. für Bakt.*, XIV, 1893, p. 756).

(5) Wright et Emerson, Ueber das Vorkommen des Bacillus Diphteriæ ausserhalb der Korpers (*Centralbl. für Bakt.*, XIV, 1894, p. 412).

(6) Seiler et Stoutz, *Revue médicale de la Suisse romande*, décembre 1904.

(7) Ledoux-Lebard, Action de la lumière sur le Bacille diphtérique (*Arch. de méd. expér.*, 1893, p. 779).

lumière diffuse n'avait pour ainsi dire aucune action sur des Bacilles se trouvant dans l'eau ou le bouillon, elle les tuait en moins de deux jours (vingt-quatre heures d'éclairement) à l'état sec, étalés en couches minces; la lumière solaire directe agit bien plus rapidement encore. Ce sont les rayons les plus réfringents qui sont actifs ; les rayons rouges ou jaunes n'ont presque pas d'action. Reyes (1), en expérimentant sur des lambeaux de toile, du papier, de la poussière souillés, a vu la virulence disparaître complètement à la lumière le seizième jour dans un milieu humide, le sixième dans l'air sec, le troisième dans l'air desséché par l'acide sulfurique. Dans la boue humide, les Bacilles sont encore très nombreux le cent vingtième jour, aussi bien au soleil qu'à l'obscurité. Dans toutes ces conditions, la virulence s'atténue graduellement. Les recherches de Pernice (2) confirment les données précédentes. On peut donc conclure que les objets souillés par des produits virulents et exposés à des conditions de milieu ordinaires ne restent dangereux qu'un certain temps; ce n'est que dans des conditions spéciales, où interviennent surtout le manque d'air, l'obscurité, l'humidité, que la virulence peut persister longtemps.

Montefusco (3) a observé que dans l'eau stérilisée la vitalité diminue vers le treizième jour et ne disparaît que vers le quarantième; la virulence y est déjà atténuée au deuxième jour. Dans le lait cru, non stérilisé, le Bacille a disparu au bout de cinq ou six jours; la virulence est déjà bien diminuée après vingt-quatre heures. Dans le lait stérilisé, on retrouve des Bacilles vivants jusqu'après quarante jours et la virulence ne baisse fort qu'après deux ou trois jours; en alcalinisant le lait, elle peut même persister une huitaine de jours. Dans le beurre, le Bacille est mort après deux jours; la virulence s'y atténue dès la sixième heure. Dans le vin, il disparaît au bout d'une demi-heure à deux heures selon le degré d'acidité. Sur le pain, le biscuit, les mets sucrés, il disparaît en deux ou trois jours. Sur la pellicule externe des fruits, le Bacille reste virulent longtemps ; en contact avec la pulpe, il est détruit en vingt-quatre à trente-six heures; il en est de même avec les légumes. Les légumes et les fruits cuits le détruisent rapidement. C'est la présence d'acides qui joue dans toutes ces conditions le principal rôle.

D'après Roux, à l'état humide le virus ne résiste pas à une température de 58°, maintenue pendant quelques minutes; sec, il supporte sans périr une chaleur de 98° pendant plus d'une heure. Une chaleur humide de 100° suffit donc pour le détruire à coup sûr.

Une des conditions qui permettent une grande dissémination du *Bacille de la diphtérie* dans le milieu extérieur et rendent la contagion facile, est la persistance, parfois assez prolongée, du microbe, doué d'une virulence plus ou moins grande, dans la bouche des personnes ayant été atteintes de diphtérie. Il est des cas où le Bacille disparaît en même temps que les fausses membranes ou quelques jours après elles; d'autres

(1) Reyes, Sulla vitalità del bacille della difterite fuori dell'organismo (*Annali d'Igiene sper.*, V, 1895, p. 501).

(2) Pernice e Scagliosi, Sulle alterazioni istologische e sulla vitalità dei bacilli di Loeffler delle pseudo-membrane difteritiche dell'uomo, studiate fuori l'organismo (*La Riforma medica*, 1895).

(3) Montefusco, Del modo di comportarsi del bacillo della difterite sulle sostanze alimentare (*Ann. d'Igiene sper.*, VI, 1896, p. 425).

fois, on le retrouve longtemps virulent, des semaines, des mois même sans qu'aucun symptôme en puisse faire soupçonner la présence chez l'individu qui en est porteur. Ce dernier pourra, surtout dans un milieu prédisposé, être une source de contage. Enfin, si, comme le pensent Roux et Yersin, et avec eux beaucoup d'observateurs, le Bacille que Loeffler a nommé *Bacille pseudo-diphtérique*, qui sera étudié plus loin, n'est qu'une forme atténuée à son maximum, dépourvue de toute virulence, du *Bacille diphtérique* vrai, il est rationnel de craindre qu'il puisse récupérer de la virulence sous des influences encore inconnues.

Un Bacille de virulence très atténuée peut en effet redevenir actif, bien que difficilement. Roux et Yersin ont obtenu un renforcement très marqué en associant un virus diphtérique très peu actif, ne donnant qu'un minime œdème au cobaye, à du Streptocoque très virulent. Or une telle association s'observe fréquemment ; d'autres, du reste, pourraient donner le même résultat. Le Bacille très atténué, le *Bacille pseudo-diphtérique*, peut se comporter de même et jouer alors un rôle actif dans l'étiologie de la diphtérie.

On trouve de ces Bacilles à virulence atténuée dans bien des cas bénins de diphtérie et à la fin dans des cas graves qui ont une terminaison favorable. Il semble qu'à mesure que la maladie s'amende, la virulence diminue en même temps et puisse même faire défaut au microbe que l'on trouve en dernier.

Lésions produites par le Bacille de la diphtérie. — La diphtérie de l'homme est toujours une infection locale ; on a dit plus haut (p. 875) dans quelles conditions toutes spéciales elle pouvait devenir une maladie générale. Le microbe se développe dans un ou plusieurs points déterminés de l'organisme où il a pu s'implanter, surtout sur les muqueuses et principalement celles des voies respiratoires, parfois sur les plaies des téguments; le poison qu'il sécrète diffuse dans le sang et produit alors les symptômes et accidents généraux : c'est une véritable intoxication. Aussi, en général, ne trouve-t-on de microbes spécifiques qu'au point d'inoculation. Cependant, dans les cas d'infection grave et profonde surtout, on peut rencontrer des Bacilles dans le sang ou dans différents organes. Frosch (1) dit en avoir ainsi rencontré 10 fois sur 15 autopsies de diphtériques ; Kutscher (2) les a trouvés 8 fois sur 9 dans le poumon, dans des foyers de bronchopneumonie, une fois dans le rein.

Localement, la diphtérie se manifeste par la production de la *fausse membrane*. C'est un exsudat de fibrine et de mucine produites par la muqueuse altérée, englobant de nombreux leucocytes et des microbes (3). Au début, on peut y rencontrer des éléments de l'épithélium de la muqueuse ; plus tard, ils font complètement défaut. D'abord mince, opaline, assez molle, la fausse membrane peut devenir épaisse, grisâtre, ferme, presque lardacée. Elle se détache assez facilement et laisse voir

(1) Frosch, Die Verbreitung des Diphteriebacillus im Körper des Menschen (*Zeitschr. für Hygiene*, XIII, 1893, p. 49).

(2) Kutscher, Der Nachweiss der Diphteriebacillen in den Lungen mehrerer an Diphterie verstorbener Kinder durch gefärbte Schnittpräparate (*Zeitschr. für Hygiene*, XVIII).

(3) Baumgarten, Untersuchungen über die Pathogenese und Aetiologie der diphterischen Membran (*Berlin. klin. Wochenschr.*, 1897, nos 31 et 32).

sous elle la muqueuse rouge, saignante, parfois ulcérée. Enlevée, elle se reproduit facilement, souvent en quelques heures. Elle s'étend fréquemment autour du point où elle s'est développée et envahit souvent de larges surfaces. Une coupe, faite après fixation dans le liquide de Flemming, d'une fausse membrane bien développée, la montre formée de deux couches d'aspect différent; la plus épaisse, celle qui est en contact immédiat avec la muqueuse, est formée de travées fibrineuses limitant des aréoles polygonales où sont inclus de nombreux leucocytes; dans la couche externe, les travées de fibrine sont appliquées les unes contre les autres, serrées, formant des strates bien apparentes, enfermant surtout des noyaux et débris de noyaux. Les *Bacilles de la diphtérie* se rencontrent surtout dans la partie superficielle de cette couche externe : ils y forment de petits amas, assez caractéristiques, où ils affectent les mêmes formes que dans les cultures. Cette couche superficielle de la fausse membrane montre fréquemment, en outre, d'autres formes microbiennes, bâtonnets divers, coccus, chaînettes, qui peuvent n'être que de simples saprophytes de la bouche sans signification ou, au contraire, jouer un rôle actif dans l'affection.

On peut rencontrer des fausses membranes sur toutes les muqueuses et sur toute la surface de la peau. On en trouve surtout et par ordre de fréquence dans la gorge, le larynx, les fosses nasales, la trachée et les bronches, la bouche, la trompe d'Eustache, l'oreille moyenne, la conjonctive, le prépuce, le gland, l'anus, le scrotum, la vulve, l'utérus; elles ne se développent que rarement sur les muqueuses à l'abri de l'air, celles de l'œsophage, de l'estomac ou de l'intestin. Il peut s'en développer sur des plaies.

La fausse membrane n'est pas cependant pathognomonique de l'infection diphtérique. D'autres microbes peuvent en produire ayant des caractères semblables à ceux de la membrane diphtérique vraie ou en différant, par une épaisseur et une extension moindres, une blancheur plus éclatante, plus d'opacité et de friabilité. Ces *pseudo-diphtéries*, se traduisant par des angines pseudo-membraneuses ou même du croup, peuvent être causées par des microbes assez divers, plusieurs *Staphylocoques*, le *Streptocoque pyogène*, le *Pneumocoque*, le *Bacille de Friedlaender*, des *Levures* même (1). On ne s'explique toutefois pas cette façon spéciale d'agir de microbes qui ne produisent jamais expérimentalement de fausses membranes. Ce n'est souvent que par l'emploi de méthodes complexes et de procédés divers qu'on peut affirmer l'exclusion de certains microbes.

Enfin le *Bacille diphtérique* peut végéter sur les muqueuses en ne produisant pas de fausse membrane. Il paraît souvent se comporter ainsi sur la muqueuse de la gorge, ne déterminant qu'une angine légère ou d'autres fois une angine grave, parfois du type des angines herpétiques ou phlegmoneuses, avec phénomènes d'intoxication diphtérique. C'est également ainsi qu'il a été rencontré dans des rhinites externes

(1) Troisier et Achalme, Sur une angine parasitaire causée par une Levure et cliniquement semblable au muguet (*Arch de méd. expér.*, 1893, n° 1). — Teissier, Sur un cas d'angine pseudo-membraneuse avec présence exclusive dans l'exsudat des formes-levures du muguet (*Arch. de méd. expér.*, 1895, p. 265). — Stœcklin, Recherches cliniques et expérimentales sur le rôle des Levures trouvées dans les angines suspectes de diphtérie (*Arch. de méd. expér.*, 1898, p. 1).

sans fausses membranes (1), dans le coryza purulent (2), dans du noma de la face (3) et dans un cas de vulvite gangreneuse (4). L'examen bactériologique seul peut permettre un diagnostic certain dans ces conditions.

Le Bacille de la diphtérie peut se rencontrer dans des collections purulentes. Seitz (5) et Hau (6) le signalent, virulent, accompagné du *Staphylocoque doré* ou du *Streptocoque*, dans du pus de panaris à marche spéciale, observé chez des enfants diphtériques ou des personnes soignant les diphtériques.

Associations microbiennes dans la diphtérie. — Assez rarement le *Bacille de Loeffler* se trouve seul dans les fausses membranes diphtériques. On peut rencontrer avec lui à l'examen direct et isoler par les cultures un grand nombre d'espèces microbiennes. Parmi elles, beaucoup sont des saprophytes qu'on peut observer normalement dans la bouche ou sur la muqueuse des voies respiratoires antérieures; elles ne paraissent avoir aucun effet sur la lésion et ne jouer aucun rôle dans l'infection. D'autres, au contraire, sont des espèces nettement pathogènes, qui peuvent avoir sur l'organisme atteint une action spéciale s'ajoutant à celle du *Bacille diphtérique* et même imprimer à l'affection des caractères particuliers, pouvant l'aggraver par exemple; mais il n'y a *association* vraie que quand les microbes secondaires sont en quantité importante. On conçoit alors tout l'intérêt que peut avoir le médecin à se renseigner exactement sur ce point (7).

Nous verrons plus loin, à propos du diagnostic bactériologique de la diphtérie, comment on peut, à l'aide des cultures, isoler et reconnaître les différents microbes qui sont souvent associés au *Bacille de Loeffler*. Nous dirons seulement quelques mots de ceux, en petit nombre, qui paraissent pouvoir influer sur le développement et l'évolution de l'affection.

Parmi ces derniers, le plus important, sans contredit, est le *Streptocoque pyogène*. Qu'il s'agisse d'une angine ou d'un croup diphtériques, l'association du Streptocoque est toujours un symptôme grave et assombrit le pronostic (8). C'est du reste conforme aux données de l'expérimentation ; nous avons vu que Roux et Yersin, et d'autres à leur suite, avaient signalé le renforcement de la virulence du Bacille de Loeffler

(1) Todd, A form of external rhinitis due to the Klebs Loeffler Bacillus, appearing in children convalescent from scarlet fever (*Lancet*, I, 1898, p. 1458).

(2) Grenet et Lesné, Présence du Bacille diphtérique dans les coryzas purulents non pseudo-membraneux de l'enfant (*Arch. de méd. des enfants*, août 1898).

(3) Freymuth et Petruschky, Zweiter Fall von Diphteriénoma (Noma faciei) (*Ibid.*, n° 38, p. 600).

(4) Freymuth et Petruschky, Ein Fall von Vulvitis gangrenosa (Noma genitalium) mit Diphteriebacillenbefund (*Deutsche med. Wochenschr.*, 1898, n° 15, p. 232).

(5) Seitz, Diphteriebacillen in einem Panaritium (*Correspondenzbl. für Schweizer aertze*, 1er novembre 1891).

(6) Hau, Panaris diphtérique (*Lyon méd.*, 28 janvier 1900).

(7) Sevestre et Widal, Les associations microbiennes et les infections mixtes (*Rapports au Congrès de médecine de Montpellier*, 1898). — Méry, Des associations microbiennes dans la diphtérie au point de vue clinique et bactériologique (*Congrès de gynécologie de Marseille*, 1898).

(8) Martin, Examen chimique et bactériologique de deux cents enfants entrés au pavillon de la diphtérie à l'hôpital des Enfants-Malades (*Ann. de l'Inst. Pasteur*, VI, 1892, p. 335). — Barbier, De quelques associations microbiennes dans la diphtérie (*Arch. de méd. expér.*, III, 1891).

par l'injection simultanée d'une culture active ou même de produits solubles du Streptocoque. Il y a lieu cependant ici de faire une distinction et de ne pas considérer comme association véritable tous les cas où l'on constate la présence de Streptocoques dans les exsudats diphtériques. Hôte normal de la bouche, le *Streptocoque pyogène* isolé de la salive, dont il paraît bien difficile de faire une espèce particulière, est la plupart du temps tout à fait dépourvu de virulence ; sa présence, dans ces conditions, ne doit pas avoir plus d'importance que celle d'un saprophyte ordinaire et par conséquent ne pas peser sur le pronostic. Il est malheureusement difficile de pouvoir se prononcer d'une façon exacte sur la virulence d'un Streptocoque isolé par cultures : même en première culture, l'activité du microbe est souvent considérablement diminuée. On ne peut guère prendre comme base le nombre des colonies obtenues dans les cultures, ni la forme ou l'arrangement des chaînettes ou de leurs éléments; nous avons vu, en traitant du *Streptocoque pyogène*, que ces caractères ne pouvaient fournir aucune indication sûre. L'état général du malade peut plutôt guider pour émettre un jugement sur le rôle que joue le Streptocoque. Il y a rôle actif certain de ce dernier lorsque l'état général est mauvais, la température élevée, montant rapidement, se maintenant au voisinage de 40°, jetage, diarrhée, gonflement ganglionnaire prononcé. Le pronostic est alors très grave: c'est la forme qu'on peut nommer *Strepto-diphtérie*. Lorsque, au contraire, l'état général reste bon, malgré la présence d'un grand nombre de Streptocoques dans les cultures ou les préparations, il n'y a pas lieu de songer à une véritable association microbienne. D'ailleurs, en usant de certains milieux, des plaques de gélose par exemple, on trouve, pour ainsi dire dans tous les cas, du Streptocoque en abondance.

Parmi les Staphylocoques, la présence des *Micrococcus pyogenes aureus* et *Micrococcus pyogenes albus* n'est de marque défavorable que lorsque leurs colonies sont abondantes. Le petit Staphylocoque désigné par Roux et Martin sous le nom de *Coccus Brisou* (p. 894) se rencontrerait surtout dans les cas bénins. D'après ces auteurs, le pronostic est plutôt bénin d'une façon générale quand des Coccus se trouvent mêlés en grande quantité aux Bacilles spécifiques.

Les cas d'association vraie avec le *Pneumocoque* paraissent être rares. Le pronostic est assez sombre. Les fausses membranes sont grises, plus épaisses. Il y a lieu, ici aussi, d'éviter de considérer comme association toute présence du *Pneumocoque* dans les préparations ou les cultures; normal dans la bouche, il peut envahir secondairement la lésion sans imprimer de caractère spécial à l'affection.

Le *Colibacille* se trouve assez fréquemment dans les fausses membranes diphtériques, surtout lorsqu'on le recherche par des méthodes appropriées, comme le bouillon phéniqué. Les fausses membranes sont souvent alors épaisses, très envahissantes, d'odeur fétide. Il peut du reste seul produire des angines graves. C'est aussi un hôte fréquent de la bouche; en sa présence, il ne faut pas trop se hâter de conclure à une association vraie, qui peut cependant exister; expérimentalement, il aggrave l'infection diphtérique (1). Dans ce cas, l'affection aurait une tendance à la chronicité.

(1) Blasi et Russo-Travali, Contribution à l'étude des associations bactériennes dans la diphtérie (*Ann. de l'Inst. Pasteur*, X, 1896, p. 387).

Kuhnau (1) signale l'association du *Proteus vulgaris* dans plusieurs cas de diphtérie grave, s'étant terminés par la mort. Les fausses membranes avaient pris rapidement une apparence gélatiniforme et subissaient rapidement une fonte putrilagineuse, déterminant même la gangrène des amygdales sous-jacentes, de la nécrose des parties molles et des masses ganglionnaires voisines. Le *Proteus* isolé était très virulent pour les souris et les cobayes. Kuhnau attribue les lésions locales au *Bacille diphtérique* et les symptômes généraux septicémiques au *Proteus*.

On rencontre encore, dans les fausses membranes diphtériques, d'autres espèces actives qui peuvent certainement parfois influer sur la maladie, se trouver en association vraie. C'est, pour ne citer que les principales, le *Bacille de Friedlaender*, le *Micrococcus tetragenus*, le *Leptothrix buccalis*, des *Spirilles*, des *Levures*, celle du *Muguet* par exemple (p. 879). Kossel a signalé la présence d'anaérobies dans des angines diphtériques à complications gangreneuses. La malignité de certaines diphtéries pourrait parfois dépendre de certaines associations peu connues (2).

RECHERCHE ET DIAGNOSTIC

La recherche et la constatation du *Bacille diphtérique* ont une très grande importance pour établir un diagnostic précis; les procédés qui y conduisent passent dans la pratique médicale courante.

Au point de vue du diagnostic, la constatation du *Bacille de Loeffler* peut seule donner la certitude de la diphtérie; au point de vue du pronostic, on peut tirer des examens des indications précieuses. C'est la seule manière de reconnaître la diphtérie quand les fausses membranes font défaut.

Pour le traitement, les avantages d'un diagnostic précoce ne sont plus à discuter. Le sérum donne des effets d'autant meilleurs qu'il est employé plus tôt; d'un autre côté, il est au moins inutile dans les pseudo-diphtéries. Du reste, un diagnostic exact est indispensable pour établir une juste statistique des résultats de la sérothérapie.

Au point de vue prophylactique, le diagnostic bactériologique de la diphtérie a une importance considérable, en ce sens qu'il permet d'isoler les individus porteurs du microbe pathogène, à un moment où les symptômes objectifs de la diphtérie font encore défaut, et de continuer l'isolement jusqu'au moment où tout danger de contagion a sûrement disparu, moment qui peut être éloigné de la disparition des symptômes, des fausses membranes en particulier. C'est l'examen bactériologique seul qui permettra d'isoler des individus porteurs d'angines en apparence bénignes, mais dues en réalité au *Bacille diphtérique*, ou atteints de *rhinites fibrineuses* si souvent dues à ce microbe, souvent sans danger pour le malade, mais cause puissante de contagion pour le voisinage.

Le diagnostic bactériologique de la diphtérie peut se faire sans trop de difficultés. Pour être complet, il doit comprendre plusieurs séries d'opérations : 1° l'examen direct de l'exsudat; 2° la mise en cultures;

(1) Kuhnau, Ueber Mischinfektion mit Proteus bei Diphterie des Halsorgane (*Zeitschr. für klin. Med.*, XXXI, 1897, p. 567).

(2) Marfan, Les angines diphtériques malignes en 1901 et 1902 (*Soc. méd. des hôp.*, juillet 1902).

3° l'inoculation des cultures; secondairement : 4° l'inoculation simultanée des cultures et de sérum antidiphtérique; 5° la recherche de l'agglutination; 6° la réaction de fixation du complément.

1° ***Examen direct de l'exsudat.*** — Le prélèvement peut se faire facilement avec un petit tampon d'ouate monté sur fil de fer, comme il a été indiqué (p. 315).

Une parcelle de fausse membrane ou du mucus recueilli est étalée sur une lamelle; si la fausse membrane est très consistante, il suffit de frotter la lamelle avec une surface fraîche; avec un tampon d'ouate, il suffit de faire un frottis sur la lamelle. La lamelle, séchée, est fixée dans la flamme, puis colorée au *bleu de Loeffler* (p. 375) ou au *bleu de Roux* (p. 378). On peut employer la méthode de Gram et une double coloration permettant de distinguer, à côté d'espèces ne se *décolorant pas* par le procédé, le *Bacille de la diphtérie* entre autres (voy. p. 827), des espèces ne restant pas colorées à son aide. La préparation est examinée avec un objectif fort à sec ou, mieux, à immersion homogène. Quand on a un grand nombre de ces préparations à faire, il est beaucoup plus commode de faire la préparation sur lame porte-objet et de se servir pour l'examen d'un objectif à immersion à l'eau; on examine sans lamelle; de cette façon, on procède bien plus rapidement et l'on économise beaucoup de lamelles.

On peut, sur de telles préparations, constater la présence des petits amas assez caractéristiques que forme souvent le Bacille de Loeffler dans les fausses membranes; mais si l'examen est négatif, il n'est pas possible, par cette seule méthode, de conclure à l'absence du microbe en question, qui peut ne se rencontrer qu'en petite quantité dans l'exsudat ou être masqué par des éléments divers.

Malgré cela, cet examen direct est toujours à recommander; c'est le seul moyen qui puisse donner des renseignements exacts sur la composition de la fausse membrane et la nature des diverses espèces bactériennes qui peuvent s'y trouver et dont beaucoup ne poussent que tardivement ou même pas du tout dans les cultures.

L'emploi des colorations de Crouch et de Neisser (p. 828) donne de meilleurs résultats que les méthodes ordinaires de coloration; la première de ces colorations semble la plus recommandable. Les apparences citées précédemment, et tout particulièrement la présence des grains colorés disposés comme il a été dit, paraissent, dans ces conditions, appartenir en propre au *Bacille de Loeffler*, et pouvoir le différencier nettement des espèces microbiennes, qui peuvent ici se trouver mélangées avec lui. C'est là un caractère précieux qui peut permettre, dans bien des cas, d'établir très rapidement un diagnostic au moins probable (1).

Cependant, il faut savoir que parfois de véritables *Bacilles de la diphtérie* ne montrent pas de ces corpuscules polaires, tandis que des *Bacilles pseudo-diphtériques* en présentent assez fréquemment. Il ne faut donc pas regarder ces particularités de coloration comme un véritable caractère spécifique, et leur attribuer une valeur absolue pour le diagnostic.

Dans les cas négatifs ou douteux, il est nécessaire de recourir à la

(1) Bigot, Diagnostic bactériologique de la diphtérie. Examen direct des fausses membranes. Thèse de Paris, 1899.

mise en cultures qui donne des indications plus complètes : de même, dans les cas positifs, la mise en cultures doit toujours apporter confirmation au diagnostic établi par l'examen direct, qui ne peut jamais être considéré que comme provisoire.

2° **Mise en cultures.** — Pour retirer de réels avantages de cette opération, il est nécessaire d'user de milieux sur lesquels le *Bacille diphtérique* pousse mieux et plus vite que la plupart des espèces qui l'accompagnent habituellement dans les produits examinés. Les milieux à conseiller sont surtout le sérum de Loeffler, le sérum ordinaire coagulé, la gélose ordinaire et la gélose de Deycke. L'ensemencement se fait en frottant sur la surface du milieu le tampon d'ouate qui a servi à recueillir l'exsudat ou un fil de platine chargé du produit virulent.

Sérum de Loeffler. — Loeffler emploie un sérum additionné d'un tiers de bouillon spécial contenant 1 p. 100 de peptone, 1 p. 100 de glucose et 0,5 p. 100 de sel (Voy. p. 830). L'ensemencement se fait sur le milieu coagulé. Le *Bacille diphtérique* y pousse très rapidement ; les colonies sont nettement visibles après une douzaine d'heures. Mais beaucoup d'espèces poussent vite sur un milieu aussi nutritif, d'où difficulté assez grande pour l'isolement ; les *Bacilles de la pomme de terre*, entre autres, peuvent envahir vite le milieu s'ils se trouvent en abondance. Pour éviter cet inconvénient, il faut recourir à des moyens spéciaux ; à Vienne, on lave rapidement les fausses membranes à l'eau boriquée et l'on ne pratique l'ensemencement qu'après; on éloigne ainsi pas mal d'espèces qui pourraient gêner; le *Bacille diphtérique* ne serait pas atteint.

Sérum ordinaire coagulé. — Roux recommande beaucoup le sérum seul coagulé qui est véritablement le *milieu de choix*. Le *Bacille diphtérique* y pousse très bien; la plupart des espèces qui l'accompagnent végètent moins bien sur ce milieu moins nutritif que le précédent ; leurs colonies grandissent moins vite, caractères précieux pour le diagnostic.

Les divers sérums paraissent également convenir. On utilise surtout le sérum de bœuf et le sérum de cheval. On peut très bien se servir de vieux sérum antidiphtérique ; les cultures y poussent aussi bien que sur sérum normal.

L'ensemencement se fait de la façon suivante : le tampon d'ouate ou un fil de platine est frotté sur la fausse membrane, sur une surface fraîche si possible. A l'aide de ce fil, *sans le recharger*, ou à l'aide du tampon, on ensemence successivement deux ou trois tubes de sérum, par deux stries chacun, ou mieux en frottant toute la surface du milieu. Les tubes sont mis à l'étuve à 37°, à l'abri de la lumière de préférence.

Le plus souvent, les cultures sont bonnes à examiner après douze à quinze heures, quelquefois même après huit heures; en tout cas, il faut les examiner au maximum avant dix-huit à vingt heures. Quelquefois, cependant, le développement est retardé ; les cultures n'apparaissent qu'après vingt-quatre heures. C'est peut-être lorsqu'on a mis en pratique des lavages antiseptiques de la gorge.

Une culture de fausses membranes diphtériques, examinée vers la quinzième heure, montre, en nombre plus ou moins considérable, des colonies du Bacille spécifique, sous la forme de petites taches arrondies,

assez saillantes, de la grosseur d'une tête d'épingle, d'une coloration blanc grisâtre, à centre plus opaque que la périphérie.

Le nombre de ces colonies est très variable; tantôt très nombreuses, elles peuvent devenir rares dans certains examens. Lorsqu'il y en a beaucoup, elles grandissent plus lentement. Elles sont naturellement plus nombreuses dans le tube ensemencé en premier.

En vieillissant, ces colonies s'agrandissent en gardant toujours la forme circulaire et leur coloration blanc grisâtre.

On doit soumettre plusieurs de ces colonies à l'examen microscopique; c'est la seule manière d'établir un bon diagnostic. Une parcelle est étalée sur la lamelle, fixée, et soumise à l'action des réactifs colorants, comme il a été dit plus haut (p. 827). On peut alors constater les caractères propres au Bacille de la diphtérie décrits précédemment (p. 824). Nous avons vu que la forme bacillaire peut donner des indications pour le pronostic (p. 824).

La méthode de Gram est aussi à employer; d'après Zupnik (1), parmi les formes bacillaires qu'on peut être exposé à rencontrer, le *Bacille de Loeffler* seul resterait coloré, les autres se décoloreraient.

Il faut prélever de ces colonies bien isolées pour ensemencer des bouillons qui serviront aux inoculations.

Très peu d'espèces poussent aussi rapidement sur le sérum simple; la plupart de ces dernières se distinguent aux caractères particuliers de leurs colonies. Il est important de pouvoir reconnaître ces espèces d'une façon certaine.

C'est d'abord les colonies du *Bacille* dit *pseudo-diphtérique*, qui ne doit être, comme nous le verrons plus loin, qu'un *Bacille diphtérique* tout à fait dépourvu de virulence. Les colonies sont identiques à celles du Bacille virulent; la forme est en tout semblable. L'inoculation seule peut renseigner. Cependant, le *Bacille pseudo-diphtérique* ne se présente que sous la forme de bâtonnets assez courts; si l'on trouve des Bacilles longs, intriqués, enchevêtrés, on a plutôt affaire au vrai *Bacille diphtérique*.

Plusieurs espèces de *Coccus* peuvent donner des colonies arrondies, blanchâtres, ressemblant plus ou moins à celles du Bacille de Loeffler et poussant parfois aussi rapidement sur sérum. L'examen microscopique lèvera facilement tous les doutes : les éléments, arrondis, n'ont aucune ressemblance avec les formes bacillaires.

Un des plus fréquents est un petit Microcoque nommé par Roux et Martin *Coccus Brisou*, du nom de l'enfant qui l'a d'abord fourni. Les colonies sont plus blanches, plus transparentes, moins saillantes, d'une épaisseur plus uniforme. L'examen microscopique les montre formées de Coccus ronds, disposés en Staphylocoques, plus petits que les éléments du *Staphylocoque doré*. Comme cette espèce est encore peu définie, il vaut mieux donner ci-après les caractères qu'on lui attribue (Voy. p. 894).

Les colonies du *Staphylocoque doré* et du *Staphylocoque blanc* se reconnaissent à leur opacité plus grande, leur épaisseur uniforme, leurs bords taillés à pic, leur donnant au microscope l'aspect de gouttelettes

(1) Zupnik, Ueber Variabilität der Diphtericbacillen (*Berlin. klin. Wochenschr.*, 1897, n° 50, p. 1085).

d'huile. La coloration du premier ne devient bien évidente qu'après quelques jours. L'examen microscopique fera de suite voir la forme ronde des éléments et leur disposition en amas.

Le *Streptocoque pyogène* est fréquent dans ces conditions, seul ou associé au *Bacille diphtérique*. Ses colonies poussent très vite sur sérum, aussi vite que celle du Bacille de Loeffler, mais restent toujours très petites. C'est un semis de très petites gouttelettes muqueuses, transparentes, incolores, qu'on distingue surtout en regardant de biais la surface ensemencée. L'examen microscopique fera reconnaître de suite les chaînettes plus ou moins longues ; on peut y retrouver, selon le cas, les aspects divers décrits précédemment (p. 393).

D'autres Microcoques peuvent encore se rencontrer accidentellement dans ces cultures sur sérum, principalement le *Pneumocoque* et le *Tétragène*; le simple examen microscopique fera de suite reconnaître la forme des éléments et permettera de les distinguer du Bacille de Loeffler.

Gélose ordinaire. — La gélose peptonisée est un très bon milieu pour le *Bacille de la diphtérie*; malheureusement, elle convient aussi à beaucoup d'espèces qui peuvent se trouver avec lui dans les fausses membranes. L'emploi des cultures sur gélose permet donc, mieux que le sérum, de renseigner sur la nature de ces dernières. Le *Streptocoque pyogène*, en particulier, pousse très bien sur ce milieu ; il y donne des colonies d'aspect très caractéristique, qui ont été décrites précédemment (p. 456). L'emploi de la gélose permet de reconnaître combien sa fréquence est grande dans les fausses membranes de la diphtérie et de diminuer alors l'importance de sa constatation aux côtés du *Bacille diphtérique*.

Le mieux est de verser une quantité suffisante de gélose fondue dans des boîtes de Petri bien stérilisées et de laisser refroidir. Pour la mise en culture, on soulève le couvercle et l'on ensemence en frottant la surface de la gelée avec une parcelle de membrane maintenue par un fil de platine ou avec un tampon d'ouate chargé du produit suspect. On place à l'étuve à 37° chaque boîte retournée, le *couvercle en bas* pour empêcher l'évaporation et la dessiccation de la gelée. Les cultures sont examinées au bout de dix-huit heures. La plupart des colonies ne présentent pas de caractères différentiels aussi nets que sur sérum simple, qui est certainement ici le milieu à préférer; la gélose, en particulier, est à réserver pour reconnaître les espèces associées au *Bacille diphtérique*.

Gélose de Deycke. — La préparation de cette gélose aux albuminates alcalins a été indiquée page 249. On l'emploie comme la précédente, en boîtes de Petri, et l'on suit les mêmes indications pour les cultures. Le grand avantage de ce milieu serait que le *Streptocoque* y pousserait mal, moins bien encore que sur sérum, ce qu'on n'observe pas toujours. Le *Bacille diphtérique* y présente les mêmes caractères que sur sérum.

Gélose au sérum de Tochtermann. — Tochtermann (1) recommande une *gélose glucosée au sérum* de la composition suivante : une solution de gélose à 2 p. 100 est additionnée de 1 p. 100 de peptones, 1/2 p. 100 de chlorure de sodium et d'une proportion de glucose variant de 0,3 à

(1) Tochtermann, Ein aus Blutserum gewonnener sterilisierbarer Nährboden, zugleich ein Beitrag zur Frühdiagnose der Diphterie (*Centralbl. für innere Med.*, 1895, n° 40, p. 961).

0,5 p. 100; on filtre et l'on ajoute au produit du sérum de sang de mouton à parties égales ou en proportion de 3 pour 2 de gélose. On fait bouillir le mélange pendant un quart d'heure à une demi-heure ; on filtre et l'on stérilise à la vapeur. On voit qu'il est nécessaire de prendre du sérum stérile. Il faut éviter de chauffer pendant plusieurs heures, le milieu en souffrirait. Pour l'usage, on fait fondre à chaud la quantité voulue et on la coule dans des boîtes de Petri stérilisées. Après solidification, on ensemence comme d'habitude.

Les plaques mises à l'étuve, retournées le couvercle en bas, montrent après douze heures, quelquefois même après huit heures, de petites colonies de *Bacille de la diphtérie*. Après vingt heures, ces colonies sont bien visibles à l'œil nu avec leur aspect arrondi, leur milieu sombre un peu jaunâtre, leur bord transparent. Les colonies de *Streptocoque* et de *Staphylocoque* s'en différencient très bien.

Gélose au sérum de Joos. — Joos (1) dit obtenir de très bons résultats du milieu suivant, dit *sérum-agar de Joos :* 300 centimètres cubes de sérum sanguin sont mélangés à 50 centimètres cubes de solution normale de soude et 150 centimètres cubes d'eau distillée ou de bouillon. Le mélange, placé dans une fiole à fond plat, est mis, pendant deux ou trois heures, au bain-marie à 60°-70°. On laisse alors la température s'élever à 100°, ou, mieux, on place le ballon pendant une demi-heure à trois quarts d'heure dans le stérilisateur à vapeur ; on ajoute ensuite 500 centimètres cubes de bouillon peptonisé à 2 p. 100 et 20 grammes de gélose qu'on fait dissoudre le plus vite possible. Quand la solution est faite, on filtre à chaud, on répartit dans des boîtes de Petri ou dans des tubes de provision et l'on stérilise pendant un quart d'heure à 110° à l'autoclave. Ce milieu très transparent a la consistance de la gélose ordinaire avec une couleur un peu plus foncée. On peut prendre indifféremment du sérum de cheval, de bœuf, de porc ou de mouton.

Le développement du *Bacille de la diphtérie* est très rapide sur ce milieu. Souvent on peut déjà apercevoir de très petites colonies après quatre à cinq heures à 37°; après dix à douze heures, les colonies sont déjà bien développées et plus grosses que celles que présente le sérum de Loeffler après le même temps. On les voit à l'œil nu comme de petites colonies grisâtres, d'apparence humide ; au microscope, à un faible grossissement, elles sont granuleuses, d'un brun noirâtre, avec des bords irréguliers, filamenteux. Le *Streptocoque* et les *Staphylocoques* demandent plus de temps pour croître ; leurs colonies sont à peine visibles après vingt-quatre heures.

La *gélose glycérinée* ordinaire donne de très bons résultats, mais les espèces autres que le *Bacille de la diphtérie* y poussent trop vite; la différenciation devient plus difficile.

Michel (2) vante l'emploi du sérum de cheval additionné de 1 partie de bouillon de Loeffler pour 3 de sérum. Le Bacille de la diphtérie y pousse beaucoup plus vite que sur sérum simple, ou que sur sérum de bœuf simple ou additionné d'une même quantité de bouillon de Loeffler. Mais c'est un milieu également très favorable aux autres

(1) Joos, Untersuchungen über Diphteriediagnose (*Centralbl. für Bakt.*, XXV, 1899, p. 296 et 351).

(2) Michel, Das Wachstum der Diphteriebacillen auf verschiedenen Sera und Glycerinagar (*Centralbl. für Bakt.*, XXII, 1897, p. 259).

microbes qui accompagnent fréquemment le Bacille de la diphtérie.

Milieux sucrés colorés au tournesol. — D'après Rothe (1), les *Bacilles diphtériques vrais* attaquent toujours le glucose et le lévulose en produisant de l'acide, alors que les *Bacilles pseudo-diphtériques* ne modifieraient pas ces sucres ; avec le saccharose, le *Bacille diphtérique* produit une réaction alcaline. Il conseille, pour sa différenciation, l'emploi d'un milieu composé ainsi qu'il suit : on mélange 1 partie de bouillon neutre non sucré et 4 parties de sérum de bœuf ; à 90 parties du mélange on ajoute 10 parties de teinture de tournesol neutre contenant 10 p. 100 de glucose ou lévulose. Le *Bacille diphtérique* fait virer nettement au rouge ; les *Bacilles pseudo-diphtériques* ne modifient en rien la nuance, ou donnent seulement une légère teinte rose.

Thiel (2) recommande le milieu suivant :

Peptone	1 gramme.
Nutrose	1 —
Glucose	1 —
Chlorure de sodium	0gr,50
Teinture de tournesol (Kahlbaum)	5 cent. cubes.
Eau	100 —

En résumé, c'est encore le procédé de Roux et Yersin, *ensemencement sur sérum simple coagulé*, qui présente le plus d'avantages et la plus grande facilité d'exécution. Pour être complet, toutefois, il est très utile, après avoir ensemencé des tubes de sérum comme cela a été indiqué, de faire une culture sur gélose ordinaire et une sur l'une ou l'autre des géloses dont il vient d'être parlé, ces dernières pouvant donner des indications complémentaires précieuses, que ne fourniraient pas ou imparfaitement les cultures sur sérum.

Il est, du reste, facile aux médecins d'ensemencer directement des tubes de sérum au lit même du malade en touchant les fausses membranes ou la muqueuse suspecte avec un fil de platine stérilisé. Ces tubes seront alors adressés au plus tôt aux laboratoires qui s'occupent du diagnostic bactériologique de la diphtérie. Les résultats de l'examen pourront être donnés d'ordinaire de douze à dix-huit heures après la mise à l'étuve ; quelquefois plus tôt, après huit ou neuf heures ; d'autres fois plus tard, surtout quand on a fait des lavages de la gorge avec des antiseptiques forts qui retardent le développement microbien.

3° ***Inoculation des cultures.*** — L'examen microscopique ne renseigne pas sur le degré de virulence que possèdent les microbes observés. L'expérience démontre qu'on ne peut pas se fier complètement aux données de Martin qui regarde les formes courtes du *Bacille diphtérique* comme peu virulentes et les formes longues, les bâtonnets intriqués, enchevêtrés, comme très actives On rencontre des formes longues très peu virulentes ou même tout à fait inactives, et des formes courtes, très virulentes. On peut enfin avoir affaire à un Bacille du type pseudo-diphtérique.

La plus ou moins grande abondance des colonies diphtériques dans

(1) Rothe, Beitrag zur Differenzierung der Diphteriebazillen (*Centralbl. für Bakt.*, 1re Abth., Orig., XLIV, 1907, p. 618).

(2) Thiel, Diphteriebacillen aus flüssigen Lakmus-Nutrose Nahrboden (*Hygienische Rundschau*, 1907, n° 21).

les cultures peut être une indication, un Bacille très virulent en donnant d'ordinaire beaucoup plus qu'un autre peu virulent; mais ce n'est pas là non plus une indication formelle.

Pour faire un examen complet, il faut recourir à l'inoculation au cobaye. On ensemence des cultures en bouillon et, après un ou deux jours de séjour à l'étuve, on inocule un cobaye avec 1 centimètre cube de culture, comme il a été dit précédemment (p. 850). Si l'animal succombe avec les symptômes caractéristiques, on a la preuve incontestable de la nature diphtérique du produit; l'époque de la mort, plus ou moins éloigné du moment de l'inoculation, renseigne sur le degré de l'activité du microbe. Il est à recommander d'ensemencer le bouillon qui doit fournir la culture à inoculer avec plusieurs des colonies que l'on a obtenues dans les premières recherches, de façon à éviter de tomber sur une colonie peu ou pas virulente qui ne donnerait alors que des renseignements imparfaits.

Il serait désirable que l'on pût opérer de même avec le *Streptocoque* lorsqu'on le rencontre avec le *Bacille diphtérique*; il serait alors possible de déterminer la part qu'il a dans l'association. Malheureusement, la virulence de ce microbe se modifie tellement, même en première culture, qu'on ne pourrait guère se fier aux résultats observés, sauf dans les cas très positifs cependant.

4° ***Emploi du sérum antidiphtérique.*** — Pour distinguer un *Bacille diphtérique vrai* d'un *Bacille pseudo-diphtérique* un peu virulent pour le cobaye, Spronck (1) conseille l'emploi du sérum antidiphtérique injecté au cobaye six à douze heures avant la culture, en quantité suffisante pour immuniser l'animal, par exemple 1 centimètre cube de sérum actif au cent-millième pour un cobaye de 300 grammes. Un cobaye témoin est naturellement inoculé avec la culture seule. Si l'on a affaire à un *Bacille diphtérique* vrai, il ne se produit rien chez l'animal immunisé, pas même une minime réaction locale; le pouvoir protecteur du sérum est manifeste. Dans ces conditions, le *Bacille pseudo-diphtérique* produit de l'œdème, plus ou moins prononcé suivant son activité. Un tel contrôle n'est plus possible, toutefois, avec un *Bacille pseudo-diphtérique* dépourvu de toute activité, ne provoquant pas de trace d'œdème au point d'inoculation.

5° ***Agglutination.*** — L'addition de sérum antidiphtérique ordinaire à des cultures bien émulsionnées de *Bacille de la diphtérie*, en proportion de 1 p. 10 ou 1 p. 20, peut produire une agglutination souvent bien évidente, avec formation de grumeaux plus ou moins volumineux, se déposant peu à peu au fond du tube, comme l'a montré le premier Nicolas (2). Schowner (3) et Wassermann (4) obtiennent des sérums plus fortement

(1) Spronck, Le diagnostic bactériologique de la diphtérie contrôlé par le sérum antidiphtérique (*Sem. méd.*, 1896, n° 40, p. 317). — *Id.*, Le diagnostic bactériologique de la diphtérie et les difficultés causées par les Bacilles pseudo-diphtériques (*Ibid.*, 1897, n° 45, p. 353).

(2) Nicolas, Les rapports de l'agglutinabilité de divers échantillons de B. de Loeffler avec leur virulence et avec le pouvoir préventif du sérum antidiphtérique à leur égard (*Soc. de Biol.*, 3 décembre 1898).

(3) Schowner, Ueber Differenzierung der Diphteriebazillen von den Pseudodiphteriebazillen durch Agglutination (*Wiener klin. Wochenschr.*, 1902, p. 1274).

(4) Wassermann, Ueber eine neue Art von Diphteriesérum (*Deutsche med. Wochenschr.*, 1902, p. 785).

agglutinants en faisant intervenir des injections de corps bacillaires tués par une température de 60°.

Toutefois l'agglutination paraît inconstante. Il est des échantillons de *Bacilles diphtériques* vrais, bien reconnus comme tels à tous leurs caractères, en particulier à leur virulence et à leur pouvoir toxigène, qui ne montrent pas trace d'agglutination. Lorsque la réaction fait défaut, il est donc difficile d'en tenir compte. En tout cas, lorsqu'elle se produit, elle ne paraît pas pouvoir renseigner sur la virulence du microbe employé (1). La réaction peut également s'observer avec du sérum sanguin de diphtériques, mais aussi irrégulièrement (2).

6° ***Fixation du complément.*** — D'après Lambotte (3), la réaction de *fixation du complément* ne pourrait pas faire distinguer le *Bacille diphtérique* du *Bacille pseudo-diphtérique*. Pour Weill et Bloch (4), les résultats que peut fournir la méthode seraient précieux, parce que surtout très rapides, pouvant servir à un diagnostic extemporané. L'antigène à prendre est une dilution dans de la solution physiologique des mucosités recueillies, 6 gouttes ; la sensibilisatrice, du sérum antidiphtérique, 6 gouttes ; 1 ou 2 gouttes de sérum de cobaye, à complément ; 12 gouttes du mélange hémolytique inactivé.

BACILLES PSEUDO-DIPHTÉRIQUES

Loeffler (5), en 1887, a le premier signalé dans les fausses membranes diphtériques un Bacille semblable comme formes et cultures au Bacille diphtérique vrai, mais en différent par son manque de virulence, et a proposé de le nommer *Bacille pseudo-diphtérique*. Von Hoffmann-Wellenhof (6) l'a retrouvé peu après dans les fausses membranes diphtériques, dans des diphtéries consécutives à la rougeole et à la scarlatine, dans une angine catarrhale simple et enfin sur une muqueuse tout à fait normale. Zarniko (7), Escherisch (8), Spronck (9) sont, entre autres, avec Loeffler, partisans de la séparation absolue des deux espèces. Roux et Yersin (10), au contraire, ne font du *Bacille pseudo-diphtérique* qu'une forme très atténuée du *Bacille diphtérique vrai*. D'après ce que l'on sait,

(1) Nicolas, L'agglutination du B. de Loeffler par le sérum antidiphtérique est-elle constante ? (*Soc. de Biol.*, 4 juin 1898).

(2) Bruno, Ueber Diphtericagglutination und Serodiagnostik (*Berlin. klin. Wochenschr.*, 1898, n° 51, p. 1127).

(3) Lambotte, Les sensibilisatrices des Bacilles diphtériques et pseudo-diphtériques (*Centralbl. für Bakt.*, XXX, 1901).

(4) Weill, Hallé et Bloch, Diagnostic rapide de la diphtérie par la méthode rapide de la fixation du complément (*Tribune méd.*, 11 juin 1910, p. 376).

(5) Loeffler, Untersuchungen über Diphteriebacillen *Centralbl. für Bakt.*, II, 1887, p. 105).

(6) Von Hoffmann-Wellenhoff, Untersuchungen über den Klebs-Löfflerschen Bacillus (*Wiener med. Wochenschr.*, 1888).

(7) Zarniko, Beiträge zur Kenntniss des Diphteriebacillus (*Centralbl. für Bakt.*, VI, 1889).

(8) Escherisch, Zur Frage der Pseudodiphteriebacillus und der diagnostischen Bedeutung der Löfflerschen Bacillus (*Berlin. klin. Wochenschr.*, 1893).

(9) Spronck, Le diagnostic bactériologique de la diphtérie contrôlé par le sérum antidiphtérique *Sem. méd.*, 12 août 1896) — *Id.*, Le diagnostic de la diphtérie et les difficultés causées par les Bacilles pseudo-diphtériques (*Ibid.*, 29 septembre 1897).

(10) Roux et Yersin, Contribution à l'étude de la diphtérie ; 3e mémoire (*Ann. de l'Inst. Pasteur*, IV, 1890, p. 409).

en effet, de l'atténuation et de la disparition complète de la virulence de certains microbes, il est difficile de baser une distinction spécifique sur ce seul caractère; le retour non observé à l'état virulent n'est pas une objection à faire, car on sait que nous ne sommes pas encore en mesure de faire toujours reparaître un caractère biologique perdu par une espèce.

Il serait, cependant, du plus haut intérêt d'élucider cette question, au point de vue de l'étiologie et de la prophylaxie de la diphtérie d'abord, ensuite à celui du diagnostic bactériologique de cette affection. Si le *Bacille pseudo-diphtérique*, en effet, n'est qu'une forme très atténuée du *Bacille diphtérique*, il est à craindre qu'il puisse, dans des circonstances que nous ne connaissons pas, peut-être avec l'action simultanée d'autres microbes, récupérer sa virulence, et, de simple saprophyte, devenir pathogène. D'un autre côté, le diagnostic bactériologique de la diphtérie par le seul examen des cultures reste douteux, la recherche de la virulence par l'inoculation devient nécessaire.

Les auteurs cités en premier donnent comme caractères distinctifs des particularités d'aspect, de coloration ou de culture, qui, il faut le reconnaître, sont loin d'être constantes et avoir conséquemment la valeur qu'ils leur attribuent.

Pour d'autres observateurs, de Simoni (1) en particulier, il n'y aurait pas un *Bacille pseudo-diphtérique*, mais plusieurs *Bacilles pseudo-diphtériques* qu'on pourrait différencier par les caractères culturaux.

Voyons d'abord quels sont les caractères qui peuvent être attribués à l'ancien type de *Bacille pseudo-diphtérique.*

Morphologie. — L'observation démontre que ce Bacille peut présenter la même variation de formes que le *Bacille diphtérique*. Pour certains, Spronck entre autres, la forme courte serait plus fréquente, peut-être même typique; mais il faut reconnaître qu'on rencontre de longs bâtonnets, du vrai type diphtérique, enchevêtrés, à dispositions rappelant celles qu'on trouve chez le *Bacille de Loeffler* virulent. La disposition parallèle serait ici plus commune; Martin le signale aussi pour son Bacille court. Dans les cultures âgées, on peut rencontrer des formes en massues.

Les réactions colorantes ne peuvent guère donner de résultats précis. Elles paraissent bien voisines, sinon identiques, dans les deux types; la méthode de Gram *décolore* régulièrement. Les colorations de Neisser et de Crouch, données trop souvent comme différentielles (p. 828 et 829), ne peuvent servir ici, le *Bacille pseudo-diphtérique* pouvant montrer ses corpuscules polaires identiques à ceux que donne le *Bacille diphtérique* vrai. Fraenkel (2) dit cependant n'avoir eu qu'une fois la réaction avec la méthode de Neisser sur cinquante-quatre cultures de *Bacille pseudo-diphtérique*.

Cultures sur sérum coagulé. — Les colonies apparaissent aussi en quinze à vingt heures vers 37°. Leur aspect est absolument le même qu'avec le *Bacille diphtérique*. On a signalé une coloration plus blanche, un aspect plus humide; il est très difficile de saisir la différence.

(1) De Simoni, Beitrag zur Morphologie und Biologie der Pseudodiphteriebacillen (*Centralbl. für Bakt.*, XXVI, 1899, p. 673 et 757).

(2) C. Fraenkel, Die Unterscheidung der echten und der falschen Diphteriebacillen (*Berlin. klin. Wochenschr.*, 1897, n° 50, p. 1087).

Cultures sur gélose. — Le *Bacille pseudo-diphtérique* pousserait plus abondamment et plus vite ; ses colonies seraient bien visibles à l'œil nu, quand celles du *Bacille de Loeffler* ne se distingueraient qu'à la loupe. Il se forme un revêtement blanc, assez épais, humide. Escherisch a signalé une coloration brunâtre du milieu de culture s'étendant de la surface aux parties profondes; beaucoup ne l'ont jamais observée. Elle ne se remarque pas en tout cas avec le *Bacille diphtérique*.

Cultures sur gélatine. — Zarniko et Escherisch disent qu'il pousse très bien sur gélatine à la température de la chambre, tandis que le *Bacille diphtérique* n'y végète que très peu à partir de 23°.

Cultures dans le bouillon. — Le *Bacille pseudo-diphtérique* pousse abondamment et ne *rend jamais le bouillon acide*; deux ou trois jours après l'ensemencement, le bouillon est fortement alcalin, plus qu'au début, alors qu'à ce moment les cultures du *Bacille diphtérique* ont déjà une réaction nettement acide. Les cultures donnent la réaction de l'indol.

Cultures dans les milieux sucrés. — Les milieux sucrés permettraient une différenciation facile (Voy. p. 888).

Le *Bacille pseudo-diphtérique* ne produisant jamais d'acidité aux dépens du glucose, du lévulose et du saccharose particulièrement, la teinture de tournesol ajoutée au milieu ne vire pas au rouge; la réaction est au contraire alcaline. Il faut cependant reconnaître qu'on peut parfois obtenir un virage tardif au rouge indiquant que la propriété de produire de l'acide dans ces conditions existe, mais très amoindrie, à l'état rudimentaire. On en peut conclure qu'une telle propriété ne peut guère à bon droit être regardée comme un véritable caractère spécifique, pas plus que la virulence, par exemple, dont elle paraît suivre assez nettement aussi les variations (1).

Inoculation expérimentale. — Les cultures sont absolument sans action bien marquée sur le cobaye, même à la dose de 4 à 5 centimètres cubes. Spronck signale cependant parfois, avec une dose de 1 centimètre cube en inoculation sous-cutanée, la production d'un petit œdème au point d'inoculation, disparaissant au bout de quarante-huit heures, et, avec des doses de 3 centimètres cubes, la production de symptômes généraux : manque d'appétit, hérissement du poil, diminution de poids. D'après lui, le sérum antidiphtérique n'aurait aucun effet préventif sur cette réaction locale, mais en augmenterait plutôt l'étendue; ce qui démontrerait bien que l'on n'a pas affaire à un *Bacille diphtérique* atténué, mais à un type distinct. Le sérum servirait ici de moyen de diagnostic.

La présence de ce *Bacille pseudo-diphtérique* est fréquente, même chez les individus sains. Hoffmann l'a trouvé 26 fois sur 45 personnes n'ayant pas la diphtérie. Roux et Yersin le signalent 26 fois sur 59 enfants de l'école d'un village où depuis longtemps ne s'était montré aucun cas de diphtérie et souvent chez des enfants atteints d'angine simple ou rubéolique; dans ces cas, le Bacille est très rare, les tubes ensemencés avec du mucus ne donnent que quelques colonies. On doit le regarder comme un hôte fréquent de la cavité buccale (2).

(1) Goodman, Variability in the diphteria groupe of Bacilli (*Journal of infection diseases*, V, 1908, p. 421).

(2) Sacquépée, Les porteurs de germes (Bacilles diphtériques) (*Bull. de l'Inst. Pasteur*, VIII, 1910, p. 689). — Job, Bacilles diphtériques vrais et Bacilles pseudo-diphté-

Comme on peut rencontrer tous les intermédiaires entre un *Bacille diphtérique* très virulent et un Bacille très atténué, ou tout à fait inactif, que nous savons, d'un autre côté, qu'il est très difficile de faire reparaître la virulence d'un Bacille très atténué, il semble assez rationnel d'admettre que ce *Bacille pseudo-diphtérique* peut, dans bien des cas au moins, n'être qu'une forme tout à fait atténuée du *Bacille diphtérique* vrai.

C'est aussi la conclusion à laquelle arrive Lesieur (1) dans un important travail. Pour lui, dans 80 p. 100 des cas les Bacilles pseudo-diphtériques sont des Bacilles de Loeffler atténués; 20 p. 100 à peine appartiennent à plusieurs espèces étrangères à la diphtérie. Il croit alors qu'il est prudent d'observer, vis-à-vis de tous les Bacilles dits *pseudo-diphtériques*, les mêmes mesures de prophylaxie que vis-à-vis le Bacille de Loeffler. Pour d'autres, il y a entre les deux types des grandes ressemblances, mais les différences sont suffisantes pour en faire deux espèces distinctes (2).

On a certainement abusé de cette qualification générale de *Bacille pseudo-diphtérique* en réunissant sous ce nom des microbes très divers qui peuvent ne présenter avec le *Bacille diphtérique* vrai que des rapports assez éloignés, qui ne lui ressemblent guère par exemple que par quelques particularités de coloration. On en trouvera une énumération assez longue et les indications bibliographiques dans un mémoire de De Simoni (3). Beaucoup de ces espèces semblent devoir être nettement écartées comme *Bacilles pseudo-diphtériques*; il en est de même du *Bacille pseudo-diphtérique sporogène* décrit antérieurement par ce même auteur (4). Ceci peut encore faire ressortir l'importance de l'inoculation et de l'emploi du sérum préconisé par Spronck (p. 889) pour le diagnostic exact du *Bacille de la diphtérie*.

Ces Bacilles, désignés comme pseudo-diphtériques, ne se rencontrent pas seulement dans les conditions où l'on trouve le *Bacille de la diphtérie*, dans les fausses membranes principalement, mais dans bien d'autres conditions.

On en a signalé sur les muqueuses buccale ou nasale, saines ou malades, sur la conjonctive oculaire, sur la muqueuse vaginale (5), dans des crachats divers, dans la gangrène pulmonaire, dans l'exsudat pneumonique, dans des sécrétions d'otites, sur la peau dans des cas d'acné ou d'eczéma, dans des pustules de variole, dans le pus de phlegmon du cou (Reclus), dans le contenu intestinal de dysentériques (Kruse et Pasquale) (6).

Le *Bacille du xérosis épithélial de la conjonctive* paraît bien n'être que le *Bacille pseudo-diphtérique* ordinaire qui se trouve en grande

riques (*Journ. de physiol.*, XII, 1910, p. 220). — Roussel et Malard, Bacilles diphtériques et Bacilles pseudo-diphtériques (*Revue d'hygiène*, XXXII, 1910, p. 1060).

(1) Lesieur, Les bacilles dits *pseudo-diphtériques*. Thèse de Lyon, 1901.

(2) Lewandowsky, Die Pseudo-diphteriebacillen und ihre Beziehungen zu den Diphteriebacillen (*Centralbl. für Bakt.*, 1re Abth., Orig., XXXVI, 1904, p. 336 et 472).

(3) De Simoni, Beitrag zur Morphologie und Biologie der Pseudo-diphteriebacillen (*Centralbl. für Bakt.*, XXVI, 1899, p. 673 et 757).

(4) De Simoni, Ueber einen sporogenen Pseudo-diphterie-Bacillus (*Centralbl. für Bakt.*, XXIV, 1898, p. 294).

(5) Veillon et Hallé, *Arch. de méd. expér.*, VIII, 1896.

(6) Kruse et Pasquale, *Zeitschr. für Hygiene*, XVI, 1894.

abondance sur la conjonctive malade et se rencontre également sur la conjonctive saine. Il ne présenterait jamais de corpuscules polaires par la coloration de Neisser (1). Ce *Bacillus xerosis* acidifie les milieux additionnés de glucose et de saccharose et alcalinise ceux additionnés de dextrine, que le *Bacille diphtérique* acidifie.

On a signalé la présence d'un *Bacille pseudo-diphtérique* dans le contenu des pustules de variole et vaccine. Il paraît s'y trouver en simple saprophyte et diffère très peu du Bacille d'Hoffmann.

Klein (2) aurait isolé un *Bacille pseudo-diphtérique* du poumon d'un rat blanc ; il le nomme *Bacterium murium*. Zupnik (3) aurait reconnu le même type, sous le nom de *Bacterium muris*, comme cause d'une épidémie sévissant sur les rats blancs.

COCCUS BRISOU

C'est un petit Microcoque ainsi nommé par Roux et Martin (4), du nom de l'enfant qui le leur a fourni le premier.

Les éléments sont de petits coccus immobiles, souvent en diplocoques ou en petits amas de forme irrégulière. On en trouve souvent un grand nombre dans la fausse membrane.

Ils se colorent bien au bleu de Loeffler et au bleu de Roux et *restent colorés* par la méthode de Gram.

C'est un microbe aérobie, se cultivant bien sur les milieux habituels à 37° (5).

Sur *plaques de gélatine*, il forme de petites colonies qui liquéfient le milieu.

Le *bouillon* est troublé régulièrement.

Sur *sérum*, l'ensemencement, fait pour le diagnostic, donne des colonies arrondies, blanchâtres, peu saillantes, atteignant en moins de vingt-quatre heures la grosseur d'une tête d'épingle. Le sérum n'est jamais liquéfié.

Sur *gélose*, le développement se fait bien.

Le *lait* n'est pas coagulé.

Les cultures n'ont aucune action pathogène.

Il ne se forme pas d'acide dans les cultures ; les nitrates ne sont pas réduits.

On le trouve souvent dans les angines, seul ou associé au *Bacille de Loeffler*.

Les fausses membranes que produit ce Coccus sur les muqueuses ressemblent souvent beaucoup à celles du *Bacille de Loeffler* ; elles se reproduisent aussi très vite lorsqu'on les enlève. Elles paraissent cependant plus friables, moins élastiques et plus blanches.

(1) Francke, Xérose, Diphterie und Pseudodiphterie-bacillus (*Münch. med. Wochenschr.*, 1898, n° 16). — Schanz, Der sogenannte Xerosebacillus und die ungiftigen Loeffler'schen Bacillen (*Zeitschr. für Hygiene*, XXXII, 1899, p. 435).

(2) Klein, Ein neuer pathogener Microbe, zur Gruppe der Diphteriebacillen gehörig (*Centralbl. für Bakt.*, 1re Abth., Orig., XXXIII, 1903, p. 488).

(3) Zupnik, Bacterium muris (*Ibid.*, XXXIV, 1903, p. 213).

(4) Roux, Martin et Chaillou, Trois cents cas de diphtérie traités par le sérum antidiphtérique (*Ann. de l'Inst. Pasteur*, VIII, 1894, p. 650).

(5) Routh, Micrococcus Brisou (*Boston med. and. Surg. Journ.*, CXXXIV, 1896, n° 4, p. 83).

L'existence du *Coccus Brisou* avec le *Bacille diphtérique* serait d'un pronostic favorable.

Ce Coccus Brisou est peut-être à identifier avec le *Microcoque* de Barbier (1) qui se développe lentement sur la gélatine et n'est pas pathogène pour le cobaye.

DIPHTÉRIES ANIMALES

Un certain nombre d'espèces animales peuvent présenter des symptômes rappelant la diphtérie de l'homme, entre autres montrer les fausses membranes typiques dans la gorge, le larynx, la trachée, voire même être atteintes de vrai croup.

Ce sont surtout les oiseaux, principalement ceux de basse-cour, qui sont sujets à ces diphtéries ; les lapins, les veaux, les moutons, exceptionnellement le chien, montrent des affections similaires. On a voulu faire jouer à ces affections, principalement à celle des oiseaux, un rôle important dans la transmission de la diphtérie à l'homme et la production d'épidémies. Les recherches expérimentales prouvent qu'il n'y a le plus souvent aucun rapport avec le *Bacille diphtérique* et les microbes isolés dans ces différents cas; les rapports observés, si l'on a été en présence de diphtérie vraie chez l'homme, ne doivent être considérés que comme de simples coïncidences. Cependant bien des faits anciens d'observation clinique, quelques faits appuyés de preuves bactériologiques, comme celui de Loir et Ducloux, démontrent que ces affections peuvent s'implanter chez l'homme, y causant non plus de la diphtérie vraie à Bacille de Loeffler, comme on l'a voulu longtemps, mais des affections pseudodiphtériques comme celles que nous avons vu pouvoir se développer sous l'influence d'autres infections microbiennes. D'autre part, plusieurs animaux domestiques, le chat, la vache, semble-t-il, peuvent gagner la diphtérie vraie au contact de l'homme, et être ainsi une source de contage. On voit par là que le médecin est loin d'avoir à se désintéresser de ces diphtéries animales.

DIPHTÉRIE AVIAIRE

Un grand nombre d'oiseaux de basse-cour, de faisanderie, de volière, sont sujets à une affection diphtérique qui se caractérise par un exsudat se produisant à la surface de la muqueuse de la bouche et du pharynx, montrant une grande tendance à s'étendre aux fosses nasales et à la muqueuse oculaire. Il se forme des fausses membranes souvent épaisses, d'une consistance plutôt caséeuse qu'élastique. Ces fausses membranes, enlevées, se reproduisent très rapidement; elles peuvent avoir une odeur forte, fétide. Chez la poule, la maladie se localise souvent sous la langue ; il s'y forme une fausse membrane jaunâtre, consistante, élastique, difficile à détacher (*pépie*); au-dessous, la muqueuse est intacte ou ulcérée, parfois même nécrosée.

La santé, peu altérée au début, est atteinte à la longue. L'oiseau peut

(1) Barbier, De quelques associations microbiennes dans la diphtérie (*Arch. de méd. expér.*, III, 1891). — Barbier et Ulmann, De la diphtérie (*Actualités médicales*).

mourir d'asphyxie s'il survient des fausses membranes dans le larynx, ou tombe dans un véritable état cachectique, se hérisse, refuse de manger, se refroidit, tombe dans le coma et meurt. On n'observe jamais de symptômes de paralysie, si caractéristiques de la diphtérie vraie.

La maladie est contagieuse de proche en proche et détermine souvent dans les élevages des épidémies meurtrières.

Cette diphtérie des volailles paraît due à plusieurs espèces microbiennes (1). Une déterminerait la diphtérie des pigeons : c'est celle que Loeffler a décrite sous le nom de *Bacillus diphteriæ columbarum*. Une ou plusieurs autres occasionneraient les diphtéries des poules, dindons, faisans, petits oiseaux. Il est certaines diphtéries des oiseaux qui semblent pouvoir être produites par des êtres d'autre nature, des Protozoaires flagellés.

Enfin, le *Bacille de Loeffler* vrai peut occasionner une diphtérie des volailles, ou des lésions pathologiques diverses. C'est ce qui résulte des recherches de Gailez (2) qui a rencontré, dans l'affection des volailles désignée par les vétérinaires sous le nom de *catarrhe contagieux* ou *morve*, un Bacille ne différant du vrai *Bacille diphtérique* que par une virulence moindre. A la dose de 3 à 5 centimètres cubes, il tue le cobaye avec des phénomènes identiques à ceux produits à dose moindre par le *Bacille diphtérique* bien virulent. Chez les poules, il reproduit les symptômes de la maladie primitive, sécrétions glaireuses des muqueuses de la bouche, des narines et de l'œil, un amaigrissement rapide, la paralysie des pattes ; l'affection est très grave et très contagieuse. Le sérum antidiphtérique a eu une action retardante certaine, mais cependant a guéri difficilement.

Gratia et Lienard (3) ont isolé de fausses membranes de volailles un assez grand nombre d'espèces microbiennes, du Colibacille, des Staphylocoques, des Streptocoques, du Tétragène et une fois seulement un Bacille semblable au Bacille de Loeffler, mais à virulence peu marquée.

Ferré (4) a isolé un Bacille se colorant bien à la méthode de Gram et présentant des caractères morphologiques voisins de ceux du *Bacille de Loeffler*, se trouvant sous les formes longues, moyennes ou courtes, donnant des cultures semblables d'aspect, virulent pour le cobaye, le lapin, les oiseaux, non virulent pour la souris. Le sérum antidiphtérique agit favorablement sur les fausses membranes qu'il provoque et sur les accidents produits par la toxine obtenue de ses cultures. Chez le cobaye et la poule, cette toxine produit particulièrement des accidents de paralysie.

Rappin et Vanney (5) ont isolé d'une épidémie de diphtérie aviaire, ayant sévi sur des centaines de volailles d'un poulailler et occasionné de nombreux décès, du *Bacille de Loeffler* dans la presque totalité des

(1) Galli-Valerio, L'état actuel de la question sur l'identité de la D. de l'homme et des animaux (*Centralbl. für Bakt.*, XXII, 1897, p. 500).

(2) Gallez, Recherches expérimentales sur l'origine aviaire de la D. (*Acad. de méd. de Belgique*, 28 mars 1896).

(3) Gratia et Liénard, Bactériologie de la D. aviaire (*Acad. de méd. de Belgique*, 30 avril 1898).

(4) Ferré, D. aviaire (*Journ. de méd. de Bordeaux*, juillet et août 1896). — *Id.*, D. humaine et D. aviaire (*Congrès intern. d'hygiène de Madrid*, 1898).

(5) Rappin et Vanney, Sur l'identité des diphtéries aviaire et humaine (*Soc. de Biol.*, mars 1911).

cas, mais un type à virulence amoindrie pour le cobaye ; la toxine obtenue à l'aide du Bacille aurait les mêmes propriétés que la toxine diphtérique ordinaire, avec une activité réduite ; le sérum antidiphtérique a permis de guérir un certain nombre d'animaux.

Il semble bien y avoir identité entre ces Bacilles et le vrai *Bacille de la diphtérie*. Toutefois il faudrait encore des données plus complètes pour pouvoir l'affirmer. Les caractères morphologiques sont peu de chose, on l'a vu ; ce qu'il est nécessaire de mettre en évidence, c'est le fait de production de la toxine spécifique et celui de la destruction de cette toxine par l'antitoxine spécifique.

Ces observations ont cependant un intérêt réel au point de vue de la transmission de la diphtérie à l'homme.

DIPHTÉRIE DES PIGEONS

La diphtérie est une affection fréquente chez les pigeons ; elle décime souvent les colombiers.

Le pigeon malade est frissonnant, a les plumes hérissées, les yeux fermés, le bec entr'ouvert, présente de la diarrhée. La gorge, la base de la langue, le palais sont couverts de fausses membranes caséeuses, jaunâtres. L'appétit disparaît vite ; il existe une soif vive. La mort survient d'ordinaire en quelques jours.

Loeffler (1) a isolé de l'exsudat et du sang des organes un Bacille spécial cause de l'affection, qu'il a nommé *Bacillus diphteriæ columbarum*. On trouve en outre, dans l'exsudat, de nombreux Microcoques et des formes de Levures.

Morphologie. — Les bâtonnets sont un peu plus longs et plus fins que ceux de la septicémie du lapin, toujours immobiles ; leurs extrémités sont arrondies; ils se disposent le plus souvent les uns à côté des autres, en petits amas. Il se *décolorent* par la méthode de Gram.

Cultures. — Culture sur gélatine. — Sur *gélatine*, en piqûre, ils donnent à la surface une petite colonie blanchâtre, ressemblant à celle du *Bacille typhique* ; le long de la piqûre, de petites colonies rondes, blanches. La gélatine n'est pas liquéfiée.

Culture sur gélose et sur sérum. — Il se forme une bande grisâtre, assez transparente.

Culture sur pomme de terre. — La culture se distingue peu facilement, par une simple nuance un peu grise, de la surface où elle se développe.

Culture en bouillon. — Il se produit un trouble léger ; les cultures ne donnent pas la réaction de l'indol.

Inoculation. — Le microbe est pathogène pour les pigeons, les souris, les lapins, les petits oiseaux ; beaucoup moins pour les poules, les rats, les cobayes ; le chien est tout à fait réfractaire.

La souris est l'animal le plus sensible. Elle succombe en cinq à dix jours à l'inoculation sous-cutanée de culture. La rate est hypertrophiée, le foie marbré, les poumons congestionnés par places. Le Bacille se retrouve en abondance dans le sang de tous les organes.

(1) Loeffler, Untersuch. über die Bedeutung der Mikroorganismen für die Entstehung der D. bei Menschen, bei der Taube und beim Kalbe (*Mitth. aus dem kaiserl. Gesundheitsamte*. II, 1884, p. 421).

Les pigeons jeunes sont plus sensibles que les vieux. L'inoculation de culture dans les muscles pectoraux donne, au bout de trois à quatre jours, une induration de la grosseur d'une noisette entourée d'une région œdématiée. Le centre se nécrose, la peau s'ulcère et l'abcès se vide; il peut se former un séquestre. En scarifiant la muqueuse buccale et mettant du produit de culture au contact des plaies, il se forme des fausses membranes, la maladie évolue et la mort survient en une à trois semaines. Les Bacilles se retrouvent dans tous les organes.

DIPHTÉRIE AVIAIRE PROPREMENT DITE

Tous les oiseaux de basse-cour, les poules principalement, peuvent présenter une affection diphtérique distincte de la précédente. La maladie est souvent grave et évolue vite, ou a une forme plus lente, se terminant quand même fréquemment par la mort ou passant à l'état chronique.

Haushalter (1) à Nancy, Loir et Ducloux (2) à Tunis, Guérin (3) à Lille, ont étudié cette affection et ont isolé des lésions un même microbe. C'est aussi le même qui a été trouvé par Muller (4) et Hausser (5) en Allemagne, par Davalos à Cuba (6).

Les fausses membranes sont tantôt sèches, tantôt molles, caséeuses. Elles peuvent envahir rapidement toute la muqueuse de la bouche, des fosses nasales, la conjonctive, ou se limiter en quelques endroits; limitées sous la langue, elles donnent ce que l'on appelle communément la *pépie*. Lorsqu'elles ne forment que des plaques isolées, elles peuvent ne déterminer aucun trouble; l'animal les conserve souvent longtemps en restant en bonne santé. Lorsqu'elles attaquent le larynx, ce qui serait assez rare, il se produit une sorte de croup. La localisation peut être intestinale avec diarrhée fétide, muqueuse, purulente ou hémorragique et cachexie rapide. On trouve parfois des lésions cutanées, autour des orifices naturels ou sur des parties dépourvues de plumes.

Les poules atteintes présentent une grande prostration et une somnolence très marquée qui leur donnent un aspect assez particulier (fig. 284).

La maladie est causée par un microbe que l'on trouve en grande abondance dans tous les tissus et liquides de l'organisme d'un oiseau qui a succombé.

Morphologie. — Les éléments sont des bâtonnets de la grandeur du *Bacille tuberculeux*, d'après Haushalter, lorsqu'on les examine dans le sang; plus courts, souvent presque ovoïdes, de forme coccobacillaire dans les cultures, arrondis aux extrémités. D'après Galli-Valerio (7), dans

(1) Haushalter, Note sur la D. aviaire; ses rapports avec la D. humaine (*Revue méd. de l'Est*, 1891, p. 289).

(2) Loir et Ducloux, Contrib. à l'étude de la D. aviaire en Tunisie (*Ann. de l'Inst. Pasteur*, VIII, 1894, p. 599).

(3) Guérin, La diphtérie aviaire. Étude expérimentale, vaccination, sérothérapie (*Ann. de l'Inst. Pasteur*, XV, 1901, p. 941).

(4) Muller, Zur Ætiologie der Geflügeldiphterie (*Centralbl. für Bakt.*, 1re Abth., Orig., XXXI, 1906, p. 423, 515 et 621).

(5) Hausser, Bakteriologische Untersuchungen über Geflügeldiphterie (*Ibid.*, XLVIII, 1909, p. 535).

(6) Davalos. La difteria aviaria en la isla de Cuba. Habana, 1904.

(7) Galli-Valerio, Études bactériologiques (*Centralbl. für Bakt.*, 1re Abth., Orig., XXXVI, 1904, p. 467).

les cultures on peut trouver des formes filamenteuses droites ou courbées, parfois avec des renflements en massue. Ils sont nettement mobiles. Ils se colorent par les procédés habituels et se *décolorent* par la méthode de Gram.

Cultures. — Ce microbe se cultive très bien sur les milieux ordinaires ; il pousse facilement à la température de la chambre. Il meurt lorsqu'on le chauffe à 60° pendant cinq minutes ; il résiste longtemps à la dessiccation.

Culture sur gélatine. — Vers 18°, il donne une culture blanche, nacrée, un peu translucide ; la gelée n'est pas liquéfiée.

Culture sur gélose. — Il forme une bande lisse, d'un blanc grisâtre.

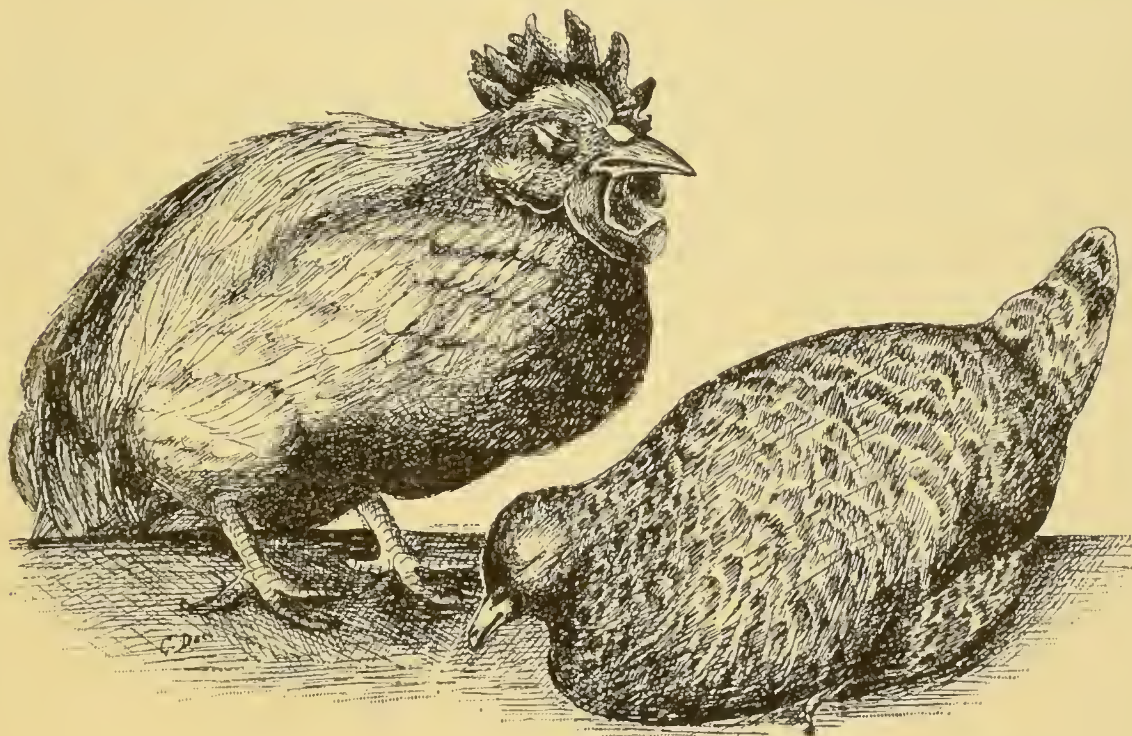


Fig. 284. — Poules atteintes de diphtérie aviaire.

Culture sur sérum. — Le développement est rapide à 37° ; la culture ressemble à celle sur gélose.

Culture sur pomme de terre. — A la température ordinaire, la culture est abondante, d'un blanc jaunâtre. D'après Guérin, ce microbe ne se cultive pas sur ce milieu.

Culture dans le bouillon. — Le développement est rapide à 35° ; le liquide se trouble uniformément.

Culture dans le lait. — Le lait est coagulé, ou non (Galli-Valerio).

Les cultures ne donnent pas la réaction de l'indol et dégagent une odeur spéciale. Le microbe fait fermenter facilement le lactose.

Inoculation. — Le microbe est pathogène pour la poule, le pigeon, le canard, les petits oiseaux, le lapin ; les cobayes et les bovidés paraissent réfractaires.

En *inoculation intraveineuse*, la mort survient en quelques jours, sans formation de fausses membranes ou avec fausses membranes dans la gorge.

En *inoculation intratrachéale*, la mort est aussi la règle, avec une grosse rate et beaucoup de fausses membranes.

En *inoculation sous-cutanée*, beaucoup d'animaux résistent, même avec 3 centimètres cubes de culture. Chez ceux qui guérissent comme chez ceux qui succombent, on n'observe jamais de réaction locale au point d'inoculation; la maladie se rapproche, par là, des septicémies hémorragiques, du choléra des poules par exemple, et s'éloigne de la diphtérie humaine.

Les poules qui ont résisté à une première atteinte de la maladie, à une inoculation de produits virulents, sont à l'abri de toute tentative d'inoculation, même d'une injection intraveineuse à dose massive; elles sont vaccinées.

Loir et Ducloux ont obtenu un vaccin actif en chauffant des cultures pendant une demi-heure à 55°. Un centimètre cube d'une telle culture, inoculé sous la peau de poules, leur donne simplement une légère augmentation de température et les met dans un état d'immunité relatif, qui est complété en inoculant comme deuxième vaccin un centimètre cube d'une culture vieille de deux mois; l'immunité est alors absolue.

Guérin obtient l'immunité chez le pigeon et la poule, par inoculation, dans le péritoine, de cultures atténuées par le chauffage d'une heure à 55° d'abord, puis à 50° en second lieu. Il aurait obtenu, avec le cheval, un sérum préventif très efficace.

Tous ces caractères démontrent avec évidence qu'il n'y a aucun rapport entre le microbe en question et le Bacille de la diphtérie humaine. Le *Bacille de la diphtérie aviaire* est peut-être à ranger parmi les *Pasteurella*. Il peut cependant se développer chez l'homme et occasionner seul une pseudo-diphtérie à fausses membranes minces peu adhérentes, comme le montre l'observation d'une angine grave, observée par Loir et Ducloux chez un enfant d'une ferme où sévissait la diphtérie aviaire, ou une sorte d'affection phlegmoneuse, comme l'a vu Thomas (1) (son Bacille cependant *restait coloré* par la méthode de Gram); il peut aussi entrer en association avec le Bacille de Loeffler sans imprimer à la diphtérie de caractère spécial.

Bordet (2) a trouvé dans la diphtérie des poules un très petit microbe immobile, n'apparaissant que comme un point aux plus forts grossissements.

Il se colore surtout bien par la méthode de Giemsa. Il ne se développe pas sur les milieux ordinaires stérilisés à l'autoclave, bien sur les milieux additionnés de sang défibriné de lapin, dans le bouillon additionné de sérum, sur la gélose au sang, où il forme une strie ou un revêtement peu perceptible à l'œil. En inoculation dans la paupière, il détermine une diphtérie oculaire identique à la maladie spontanée.

DIPHTÉRIE A PROTOZOAIRES

Davaine (3) a signalé la présence de Flagellés dans des fausses membranes diphtériques des volailles. Babès et Puscariu (4) en ont retrouvé

(1) THOMAS, La diphtérie aviaire est transmissible chez l'homme (*Gazette méd. de Paris*, 1er février 1910).

(2) BORDET et FALLY, Le microbe de la diphtérie des poules (*Ann. de l'Inst. Pasteur*, XXIV, 1910, p. 563).

(3) DAVAINE, art. *Monadines* du *Dictionnaire encyclopédique* de DECHAMBRE.

(4) Voy. CORNIL et BABÈS, Les Bactéries, II, 2e éd., p. 84.

dans la diphtérie du pigeon, mais avec le Bacille spécial; leur forme les rapproche des *Trichomonas* ou des *Cercomonas*. Pfeiffer (1) trouve des formes semblables dans les fausses membranes de la diphtérie du pigeon et admet l'existence d'une *diphtérie à Flagellés*. Mais dans ces expériences on n'a pas recherché la présence des microbes qui occasionnent d'ordinaire les affections diphtériques chez les oiseaux; les Flagellés observés peuvent bien simplement accompagner le microbe dans les fausses membranes et n'être pour rien ou pas grand'chose dans le processus pseudo-diphtérique.

DIPHTÉRIE DU VEAU

La diphtérie du veau, très rare en France, est commune en Allemagne. Elle se caractérise par la production de fausses membranes sur la muqueuse buccale, dans la gorge, parfois dans le larynx et les fausses nasales. L'animal est très abattu, a du jetage et de la diarrhée. La mort est la règle; elle survient en quelques jours ou en quelques semaines. A l'autopsie, on trouve des fausses membranes sur la muqueuse des voies respiratoires et dans l'intestin, des noyaux de pneumonie et un exsudat trouble dans la plèvre.

Damman (2) attribue la maladie à des Microcoques très abondants dans les fausses membranes. Loeffler (3) regarde comme spécifiques des bâtonnets dont la largeur est à peu près la moitié de celle du *Vibrion septique*; la longueur est de cinq à six fois la largeur. Ces bâtonnets sont presque toujours unis en longs filaments. Ils se rencontrent surtout dans les couches profondes de la fausse membrane. Loeffler n'a pas obtenu de cultures pures.

DIPHTÉRIE DE L'INTESTIN DU LAPIN

Ribbert (4) a étudié une diphtérie intestinale du lapin, sévissant sous forme épidémique.

Il en donne comme cause des bâtonnets immobiles de 3 μ à 4 μ de long sur 1 μ à 1,4 μ de large, ne *restant pas colorés* par la méthode de Gram. Ces Bactéries se trouvent non seulement dans les fausses membranes, mais dans tous les organes. Elles ne liquéfient pas la gélatine; sur gélatine et sur gélose, en strie, elles forment une bande blanche, brillante, légèrement nacrée; sur pomme de terre, une culture blanchâtre, aplatie, s'étendant lentement. Les cultures pures, en injection intraveineuse ou intrapéritonéale au lapin, amènent la mort en trois à quatorze jours, avec des symptômes septicémiques et pas de fausses membranes dans l'intestin. Des fausses membranes intestinales se produisent, si l'on inocule par la voie digestive.

(1) Pfeiffer, Beiträge zur Kenntniss der pathogenen Gregarinen (*Zeitschr. für Hygiene*, V, 1889, p. 363). — Die Protozoen als Krankheitserreger. Iéna, Fischer, 1890, p. 84.
(2) Damman, *Deutsche Zeitschr. für Thiermed.*, 1877.
(3) Loeffler, *Loc. cit.*, p. 897.
(4) Ribbert, Ueber einen bei Kaninchen gefundenen pathogenen Spaltpilz; Bacillus der Darmdiphterie der Kaninchen (*Deutsche med. Wochenschr.*, 1887, n° 8).

DIPHTÉRIES CHEZ D'AUTRES ANIMAUX

On a décrit une diphtérie du mouton, sévissant surtout sur les jeunes agneaux, où souvent on observe du croup. D'anciennes observations cliniques semblent démontrer que l'affection peut se transmettre à l'homme.

Les diphtéries du chat et de la vache, qui peuvent contagionner l'homme, sont probablement des vraies diphtéries à Bacilles de Loeffler, de provenance humaine.

On connaît des affections diphtériques chez le porc, les équidés ; l'étude bactériologique n'en a pas encore été faite.

J'ai observé un cas de diphtérie chez un chien courant. Il existait dans la gorge des fausses membranes grisâtres, montrant à l'examen microscopique de très nombreuses formes spirillaires; les essais de culture n'ont rien donné. La maladie a pris rapidement une allure grave et s'est terminée par la mort au bout de quelques jours.

La vache pourrait prendre la diphtérie de l'homme, et son lait, dans certains cas au moins, être virulent (Klein). On connaît un certain nombre d'observations cliniques qui paraissent indiquer une transmission de diphtérie à l'homme ou à des animaux réceptifs (chat) par l'usage de lait provenant de vaches suspectes d'affections diphtériques.

TABLE DES MATIÈRES

Préface V
Introduction 1
1. Historique 1
2. De la place des Bactéries parmi les êtres vivants 4
3. Origine des Bactéries 6
4. Rôle des Bactéries dans la nature 10

PREMIÈRE PARTIE

MORPHOLOGIE ET BIOLOGIE GÉNÉRALES DES BACTÉRIES

Chapitre Ier. — **Morphologie des Bactéries** 11
1. Formes 11
2. Structure 18
3. Formation des zooglées 32
4. Motilité 35

Chapitre II. — **Biologie des Bactéries** 42

I. — Fonctions des Bactéries 42
1. Respiration 42
2. Nutrition, 48. — Composition chimique des Bactéries, 49. — Aliments, 52.
3. Produits de la vie cellulaire, 57. — Diastases, 57. — Toxines, 64. — Ptomaïnes, 67. — Produits divers, 68.
4. Reproduction, 69 : 1° Multiplication par division, 70. — 2° Reproduction par spores, 74.

II. — Action de différents agents sur les Bactéries 82

1° Agents chimiques 82

Oxygène, 82. — Hydrogène, 83. — Azote, 83. — Acide carbonique, 84. — Oxyde de carbone, 84. — Hydrogène sulfuré, 84. — Hydrogène protocarboné, 84. — Antiseptiques, 85. — Anesthésiques, 92.

2° Agents physiques 93

Chaleur, 93. — Dessiccation, 103. — Lumière, 103. — Pression, 108. — Électricité, 109. — Magnétisme, 110. — Agitation, 110.

3° Microorganismes 111

III. — Action des Bactéries sur les milieux où elles vivent 112

Bactéries de putréfaction 113
Bactéries de fermentation 117
Bactéries pathogènes 120
Phagocytose 129
Pouvoir bactéricide des humeurs 132

Alexine et sensibilisatrices 135
Agglutinines 137
Précipitines 142
Antitoxines 143
Opsonines 145
Virulence 153
Immunité 160
Bactéries chromogènes 168
Bactéries photogènes 174

DEUXIÈME PARTIE
TECHNIQUE BACTÉRIOLOGIQUE

Chapitre Ier. — **Méthodes de recherche et d'étude des Bactéries**. 178

I. — **Instruments** 178
1° Microscope et accessoires 178
Ultra-microscopie, 187. — Mensuration, 190. — Dessin, 191. — Photographie, 192.
2° Appareils de chauffage 197
Appareils à stérilisation à air sec 197
Appareils à stérilisation à vapeur 199
Appareils à température constante. Étuves 207

II. — **Cultures** 221
1° Généralités sur les milieux de culture 221
2° Préparation des milieux de culture 224
1. Milieux liquides 224
Milieux liquides chimiquement définis 224
Milieux liquides végétaux 229
Milieux liquides animaux 230
Bouillon de viande peptonisé, 230. — Bouillon de peptones, 232. — Bouillon d'extrait de viande, 232.
Liquides de l'organisme 233
Sang, 233. — Sérum, 234. — Sérosités pathologiques, 238. — Urine, 238. — Lait, 239. — Œufs, 240.
2. Milieux solides 240
Milieux nutritifs à la gélatine, 240. — Milieux nutritifs à la gélose, 246. — Gélose au sang, 249. — Gélose aux albuminates alcalins, 249. — Sérum solidifié, 250. — Gelées minérales, 250. — Pommes de terre cuites, 251. — Carottes, 252. — Artichauts, 252. — Matières amylacées cuites, 252. — Œufs cuits, 253. — Bouillie de viande, 253. — Substances inertes imbibées de liquides nutritifs, 253.
3° Stérilisation 253
1. Stérilisation par les agents chimiques 254
2. Stérilisation par la chaleur 254
1. Stérilisation par la chaleur sèche 254
2. Stérilisation par la chaleur humide 254
3. Stérilisation par chauffages répétés 256
3. Stérilisation par filtration 261
4. Stérilisation par les gaz sous forte pression 271
4° Pratique des cultures 272

1. Cultures en vases fermés 273

Cultures en tubes à essai, 273. — Cultures en ballons, 276. — Cultures en tubes clos, 277. — Cultures sur pommes de terre, 278. — Cultures sur porte-objet, 279.

2. Cultures sur plaques 281
3. Cultures des anaérobies 293
4. Cultures dans les milieux colorés 308
5. Ensemencement des cultures et isolement des espèces... 311

Prélèvement de sang 313
— de pus 314
— d'exsudats 315
— de sérosités 315
Ponction de la rate, du foie, du poumon 315
Ponction lombaire 315
Prélèvement après la mort 317

6. Développement des cultures et modifications des milieux. 322
7. Procédés d'étude des produits formés dans les cultures.. 326

Recherche des ptomaïnes 327
Recherche des toxines 328
Recherche des albumoses et des peptones 329
Recherche de la mucine 329
Recherche des matières colorantes 330
Recherche des gaz 330
Recherche de l'ammoniaque 332
Recherche des nitrites 333
Recherche de la triméthylamine 333
Recherche de la leucine et de la tyrosine 333
Recherche des acides organiques 333
Recherche de l'alcool et de l'aldéhyde 334
Recherche des mercaptans 334
Recherche de la tryptophane 334
Recherche de l'indol 334
Recherche des phénols 340

8. Conservation des cultures 340

III. — Expérimentation sur les animaux 341

I. Choix de l'animal 342
II. Contention de l'animal 344
III. Inoculations 346

1° Instruments 348
2° Matière d'inoculation 351
3° Voies et méthodes d'inoculation 351

1. Inoculation par ingestion 351
2. Inoculation par inhalation 352
3. Inoculation par la peau 352
4. Inoculation intraveineuse 354
5. Inoculation intrapéritonéale 355
6. Inoculation intrapleurale 357
7. Inoculation dans la chambre antérieure de l'œil 357
8. Inoculation intracranienne 357

IV. Examen de l'animal vivant 358
V. Autopsie et discussion des résultats 358

Appendice : Expérimentation sur l'homme 359

IV. — **Préparations et étude microscopiques** 360
Examen à l'état vivant 360
Examen à l'aide de réactifs 364
I. — Fixation des préparations 365
1° Fixation par la dessiccation simple, 365. — 2° Fixation par la chaleur, 367. — 3° Fixation par les réactifs chimiques, 368.
II. — Coloration des préparations 370
1° Coloration par l'iode 370
2° Coloration par le carmin 371
3° Coloration par l'hématoxyline 371
4° Coloration par les couleurs d'aniline 371
1° Solutions colorantes simples 372
Rouge, 372. — Violets, 373. — Bleus, 373. — Bruns et orange, 374. — Verts, 374. — Noirs, 374.
2° Solutions colorantes composées 375
Solution alcaline de Koch, 375. — Solution alcaline de Loeffler, 375. — Solution anilinée d'Ehrlich, 376. — Solution de Weigert, 376. — Solution de Ziehl, 377. — Solution de thionine phéniquée, 377. — Bleu de toluidine, 377. — Bleu de Kühne, 377. — Bleu de Roux, 378.
5° Emploi des agents décolorants 378
1° Décoloration par l'alcool 379
Méthode de Gram 379
Méthode de Gram modifiée par Nicolle 379
1. Tableau des principales espèces qui restent colorées par la méthode de Gram 381
2. Tableau des principales espèces se décolorant par la méthode de Gram 382
2° Décoloration par les acides 384
3° Décoloration par d'autres réactifs 384
Méthode de Claudius 385
Méthode de Weigert 386
6° Double coloration 386
Procédé de Giemsa 388
Procédé de Marino 389
7° Recherche des Bactéries dans les tissus 389
Méthode de Gram appliquée aux coupes 390
Méthode de Nicolle-Gram 390
Méthode de Kühne-Gram 390
Méthode de Weigert 391
Méthode de Nicolle pour les Bactéries qui ne prennent pas le Gram 391
Méthode de Claudius 391
Méthode de Giemsa 391
8° Étude de quelques méthodes et procédés spéciaux 392
1. Préparations par impression 392
2. Coloration des spores 393
3. Coloration des cils 394
Méthode de Loeffler, 395. — Méthode de Nicolle et Morax, 396. Méthode de Bunge, 396. — Méthode de Van Ermenghem, 396. — Méthode de Bowhill, 397. — Méthode de Pietfield, 397.

4. Coloration des capsules 398
5. Colorations spéciales du Bacille de la tuberculose, du Bacille de la lèpre, du Bacille de la syphilis 399
6. Coloration des microorganismes dans le sang 399
III. — Montage des préparations 400
Résumé du Manuel opératoire 401
Recherche des Bactéries dans les liquides 401
Recherche des Bactéries dans les tissus 402
Des causes d'erreur dans la recherche et l'examen des Bactéries 402
V. — Méthodes biologiques 404
1. Agglutination et précipitation 405
Réaction d'agglutination et sérodiagnostic 405
Sérodiagnostic rapide au microscope 406
Sérodiagnostic lent microscopique 409
Mensuration du pouvoir agglutinant 410
Réaction de précipitation 410
2. Pouvoir opsonisant 411
3. Fixation du complément 415
4. Cytodiagnostic 418

TROISIÈME PARTIE

CLASSIFICATION ET DESCRIPTION

Généralités sur la classification 420
Plan pour l'étude des Bactéries 428
Etablissement de groupes 429
Division en familles 433
1re famille. — COCCACÉES 434
1er genre. *Micrococcus* 435
Espèces pathogènes 437
Espèces chromogènes 581
Espèces ferments ou à action indifférente 589
Tableau indiquant l'action sur la gélatine et la coloration des colonies des principales espèces du genre *Micrococcus* 612
Tableau résumant les caractères les plus importants des principales espèces du genre *Micrococcus* 614
2e genre. *Sarcina* 626
Tableau de détermination des Sarcines 639
3e genre. *Leuconostoc* 641
4e genre. *Ascococcus* 646
2e famille. — BACTÉRIACÉES 650
1er genre. *Bacillus* 650
Espèces pathogènes 653
Bacille du charbon 653
Bacille de la tuberculose 678
Bacille de la lèpre 801
Bacille de la morve 812
Bacille de la diphtérie 823

10817-10. — CORBEIL. Imprimerie CRÉTÉ.



